

كلية الصيدلة
السنة الخامسة
2024-2025



التقانة الحيوية في الصيدلة

القسم النظري

مدرس المقرر:
أ.د. محمد ياسر عبجي

مقرر كامل







منشورات جامعة حلب
كلية الصيدلة

التقانة الحيوية الصيدلية



الدكتور
محمد ياسر عبجي
أستاذ مساعد في قسم الكيمياء الحيوية
والأحياء الدقيقة

مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية
1437هـ-2016م

منشورات جامعة حلب/كلية الصيدلة
التقانة الحيوية الصيدلية
د. محمد ياسر عبجي



Aleppo University Publications
Faculty of Pharmacy

Pharmaceutical Biotechnology



Prof. Dr. M. Yaser Abajy
Department of Biochemistry
and Microbiology

Academic Year
2016-2017

سعر المبيع للطلاب

مقدمة

يُعد علم التقانة الحيوية من العلوم التطبيقية الحديثة، إذ يستفيد هذا العلم من مجمل المعارف التي توفرها العلوم الأخرى مثل الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة والبيولوجيا الجزيئية وحتى من العلوم الأساسية والهندسية، ويسخرها لإيجاد تطبيقات مفيدة على أصعدة مختلفة: طبية، صيدلانية، زراعية.... وغيرها.

تم التركيز في هذا الكتاب على التطبيقات الطبية والصيدلية للتقانة الحيوية، لكونه مخصصٌ لطلاب السنة الأخيرة من كلية الصيدلة.

يهدف الكتاب إلى تعريف الطالب بعلم التقانة الحيوية كونه من العلوم الحديثة التي لم تنتشر بعد على نطاق واسع في البلدان العربية، وتحبيب الطالب بهذا العلم واستثارة مخيلته ودفعه إلى الإقبال على هذا العلم ودراسته والتخصص فيه والعمل على إدخاله إلى بلدنا واستثماره بشكل فعال، لأن التقنيات الحيوية أصبحت أدوات لا يستغنى عنها في المعالجات الطبية والصناعات الدوائية، فضلاً عن أن شركات التقانات الحيوية أصبحت تحتل الصدارة على مستوى العالم من حيث المبيعات والأسهم.

سيتعلم الطالب من خلال هذا الكتاب كيفية استعمال الكائنات الحية الدقيقة والنباتات وخلايا حقيقيات النوى كمعامل حيوية لإنتاج مختلف المواد الدوائية من مثل الإنزيمات واللقاحات والأضداد والصادات الحيوية والكثير غيرها. كما سيطلع على الأساليب التقنية لإنتاج الكائنات المعدلة وراثياً من نباتات طبية وحيوانات التجربة وحتى الأحياء الدقيقة.

كما سيتعلم الطالب كيفية التعامل مع خلايا الكائنات العليا وكيفية عزلها وتنميتها وتسخيرها للأغراض الإنتاجية والعلاجية، بما في ذلك الخلايا الجذعية وإمكاناتها الهائلة في التمايز إلى مختلف أنواع الخلايا الأخرى وإنتاج النسج والأعضاء لاستعمالها في الطب التعويضي.

ونظراً لأن عصرنا هذا أصبح عصر النانو، فقد خصص في هذا الكتاب باب للحديث عن الأنظمة النانوية الطبيعية والصنعية وتطبيقاتها المتنوعة.

كما يتطرق الكتاب إلى الكثير من التقنيات الحيوية الحديثة كتقنية المصفوفات المجهرية وتقنيات دراسة العلاقات بين البروتينات في كل من الوسطين الزجاجي والحي.

والله من وراء القصد.

المؤلف

أ. د. محمد ياسر عجيمي

البــاب الأول

إنــتاج المواد الدوائية بـاسـتعمال تـقانـة التـخمير

Producing of Pharmaceutical ingredients using the fermentation technique

❖ الفصل الأول

تقانة التخمير Fermentation Technology

❖ الفصل الثاني

إنتاج بعض المركبات المهمة باستعمال تقانة التخمير

4

الفصل الأول

تقانة التخمير Fermentation Technology

مقدمة

اشتق مصطلح التخمير fermentation لغوياً من الكلمة اللاتينية fevere والتي تشير إلى فعل الخمائر في عصير الفاكهة أو البذور المنتشة (كما هو في إنتاج الكحول)، أما علمياً فيقصد بالتخمير: تصنيع المنتجات باستعمال مزارع ضخمة من الكائنات الدقيقة microorganisms (MOs)، فعندما تنمو الكائنات الدقيقة في أوساطها الزرعية تكون قادرة على تحويل طيف واسع من الركائز substrates إلى تنوعٍ هائلٍ من نواتج الاستقلاب metabolites. يمكن استعمال هذه الكائنات الدقيقة بشكلها البري wild type أو بعد تعديلها وراثياً (genetically modified microorganisms (GMOs، حيث أدى تطور تقنيات البيولوجيا الجزيئية إلى الحصول على نواتج استقلابية جديدة كلياً أو تحسين المردود من النواتج الاستقلابية الطبيعية.

تطبيقات التخمير

تستعمل تقنية التخمير لأهداف عدة نذكر منها:

1- الحصول على كمية كبيرة من خلايا الكائن الحي الدقيق تسمى اصطلاحاً الكتلة الحيوية Biomass.

2- الحصول على النواتج الاستقلابية للكائن الدقيق (والتي تفرز غالباً في الوسط الزرعي).

3- الحصول على إنزيمات الكائن الحي الدقيق.

4- تعديل بنية مركب ما بإضافته إلى مزرعة الكائن الحي الدقيق: بحيث نحصل على ناتج تحويل قد يكون أهم بالنسبة لنا من المركب الأول.

5- الحصول على منتجاتٍ معدلةٍ وراثياً باستعمال تقنيات تأشيب وتنسيل الدنا DNA recombination and cloning.

أولاً- إنتاج الكتلة الحيوية Biomass

يكون الكائن الحي الدقيق بحد ذاته في كثير من الحالات ذا قيمة اقتصادية لذلك نعمل على إكثاره في مزارع ضخمة ومن الأمثلة عن هذه الكائنات خميرة الجعة والعصيات اللبنية وبعض الخمائر الغذائية التي تستخدم في صناعة الألبان والأجبان.

تمتلك خميرة الجعة قيمة اقتصادية عالية فهي تدخل في صناعة المعجنات والمشروبات الكحولية، كما أنها غنية بالفيتامينات والمعادن لذلك يوجد منها مستحضرات دوائية تستخدم في حالات الحميات ونقص الفيتامينات.

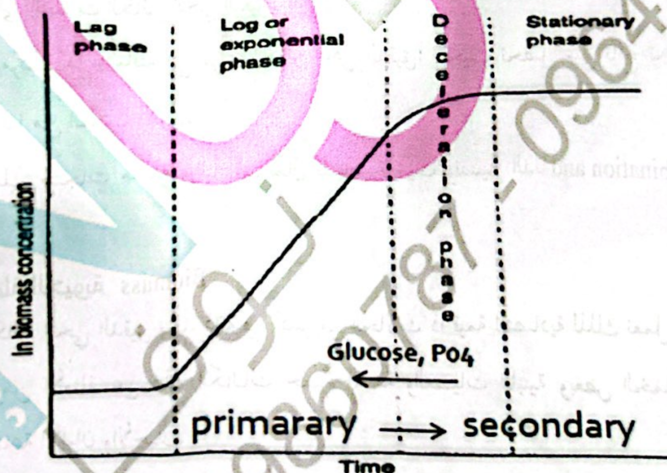
تدخل بعض أنواع جراثيم العصيات اللبنية *Lactobacillus* أيضاً في الصناعة الدوائية إذ تعطى بالمشاركة مع بعض الصادات الحيوية لتعويض ضرر الفلورا الطبيعية في الأنبوب الهضمي الناتج عن تأثير الصادات الحيوية، كما يعتقد أن تلك الجراثيم تشارك في تقوية عمل الجهاز المناعي.

ثانياً- الحصول على النواتج الاستقلابية للكائنات الدقيقة

تنتج الكائنات الحية الدقيقة خلال مراحل نموها المختلفة مستقلبات مهمة اقتصادياً، وتقسم نواتج الاستقلاب هذه إلى نواتج استقلاب أولية primary metabolites ونواتج استقلاب ثانوية secondary metabolites.

كل المواد التي تصطنعها الخلية واللازمة للنمو وللتكاثر (بروتينات، كربوهيدرات، مواد دسمة...) بالإضافة إلى المركبات الناتجة عن استهلاك الطاقة (إيتانول، أستون، بوتانول...وغيرها) تعرف بنواتج الاستقلاب الأولية. في حين أن نواتج الاستقلاب الثانوية ليس لها دور رئيس في حياة الكائن الدقيق وتعد بمنزلة نواتج تحويل للمستقلبات الأولية لأهداف عدة منها التخلص من بعض نواتج الاستقلاب الأولية الضارة بالخلية، أو قد تساعد الكائن الحي الدقيق في منع نمو الكائنات الحية الدقيقة الأخرى (حال الصادات الحيوية) وبالنتيجة تمكن الكائن الحي الدقيق من المنافسة على الموارد الغذائية.

وللحصول على ناتج استقلابي محدد على المستوى الصناعي لابد من فهم طبيعته وفي أي مرحلة يقوم الكائن الحي الدقيق بإنتاجه، ولتوضيح ذلك سنذكر بإيجاز بالمراحل التي تمر بها أي مزرعة للكائنات الحية الدقيقة (الشكل 1-1):



الشكل 1-1: مراحل نمو الكائنات الحية الدقيقة.

نلاحظ من الخط البياني أن مزرعة الكائنات الحية الدقيقة تمر بأربعة أطوار أساسية هي:

1- طور السكون أو التلاؤم lag phase: وهي المدة الزمنية التي تحتاجها الكائنات الدقيقة للتلاؤم مع الوسط التي وضعت فيه، حيث لا يلاحظ أي زيادة في عدد الكائنات الحية الدقيقة.

2- طور النمو الأسي أو اللوغارتمي log or exponential phase: طور نمو سريع تقوم فيه الكائنات الدقيقة بإنتاج المواد اللازمة للنمو والتكاثر إضافة إلى نواتج العمليات الحيوية (نواتج استقلاب أولية).

3- طور التباطؤ deceleration phase: يتباطأ فيه نمو الكائنات الحية الدقيقة نتيجة لازدياد الفضلات الناتجة عن العمليات الحيوية وقلة الموارد المتاحة في الوسط الزرعي.

4- طور الثبات stationary phase: تبدأ فيه بعض الخلايا بالموت ويستمر بعضها بالانقسام، لكن يكون عدد الخلايا الميتة يساوي عدد الخلايا المتشكلة، لذلك تصبح قيمة الكثافة الضوئية للوسط ثابتة.

ويطلق على مجموع الطورين 3 و 4 اسم Idiophase وخلال هذه المرحلة تقوم الكائنات الدقيقة باصطناع نواتج الاستقلاب الثانوية.

وتعد نواتج الاستقلاب الثانوية ذات أهمية اقتصادية خاصة، نظراً لأن كثيراً منها تمتلك قيمة علاجية والجدول (1-1) يبين بعض أهم النواتج الاستقلابية الأولية والثانوية للكائنات الدقيقة واستعمالاتها:

الجدول 1-1: أهم النواتج الاستقلابية التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة.

Secondary metabolite	*Commercial significance*
Penicillin	Antibiotic
Cephalosporin	Antibiotic
Streptomycin	Antibiotic
Griseofulvin	Antibiotic (anti-fungal)
Pepstatin	Treatment of ulcers
Cyclosporin A	Immunosuppressant
Gibberellin	Plant growth regulator
Lovastatin	Cholesterol synthesis inhibitor

Primary metabolite	*Producing organism*	*Commercial significance*
Ethanol	*Saccharomyces cerevisiae*	'Active ingredient' in alcoholic beverages
Citric acid	*Aspergillus niger*	Various uses in food industry
Glutamic acid	*Corynebacterium glutamicum*	Flavour enhancer
Lysine	*Corynebacterium glutamicum*	Feed additive
Polysaccharides	*Xanthamonas* spp.	Applications in food industry; enhanced oil recovery

ملاحظة: لا تنتج الكائنات الحية الدقيقة جميعها نواتج استقلاب ثانوية فبعضها من مثل الأمعائيات *Enterobacteriaceae* لا تنتج مستقلبات ثانوية، كما إن كل ناتج استقلاب ثانوي يمكن أن يتم إنتاجه من قبل مجموعة محددة من الكائنات الحية الدقيقة.

العوامل التي تؤثر في تصنيع نواتج الاستقلاب الثانوية:

1- تركيز الركائز substrates في الوسط:

بعض نواتج الاستقلاب الثانوية يتم اصطناعها انطلاقاً من ركيزة محددة، لذلك فمن البديهي أن زيادة تركيز الركيزة في الوسط الزرعي تؤدي إلى مردود أفضل من ناتج الاستقلاب الثانوي الموافق، فمثلاً تؤدي زيادة

تركيز التربتوفان إلى زيادة مردود القلويدات، في حين تؤدي زيادة تركيز الميثيونين إلى زيادة إنتاج السفالوسبورينات.

2- مكونات الوسط الزرعي:

تؤدي زيادة تركيز المواد المغذية في الوسط إلى زيادة نمو الكائنات الحية الدقيقة ومن ثم انزياح منحني النمو نحو الطور اللوغارتمي والحصول على نواتج استقلاب أولية أكثر، وتراجع إنتاج نواتج الاستقلاب الثانوية لأنها تُصطنع في طوري التباطؤ والثبات.

3- شروط الزرع:

من درجة حرارة وحموضة وسرعة تحريك .... وغيرها، تؤثر بشكل مشابه لتأثير مكونات الوسط الزرعي، فالشروط التي تؤدي إلى نمو أسرع للكائنات الحية الدقيقة (مثل درجة الحرارة المثالية أو التحريك المناسب) تؤدي إلى انزياح منحني النمو نحو الطور اللوغارتمي ومن ثم الحصول على مستقلبات أولية بشكل أساسي وإنقاص إنتاج المستقلبات الثانوية

ثالثاً: الحصول على إنزيمات الكائنات الحية الدقيقة

تنتج الكائنات الدقيقة إنزيمات كثيرة تمكنها من القيام بوظائفها الحيوية المختلفة، أما على المستوى التجاري فتمتلك هذه الإنزيمات تطبيقات متنوعة: تدخل في الصناعات الغذائية وصناعة المنظفات، كما أن كثيراً منها يستعمل في التشخيص المخبري للأمراض وفي طرق المعالجة السريرية. تقوم الكائنات الدقيقة بإنتاج الإنزيمات خلال طور النمو الأسي، لذا فهي تعد بمنزلة نواتج استقلاب أولية. وهناك كثير من الإنزيمات مصدرها كائنات عليا نباتية أو حيوانية حيث يمكن الحصول عليها بالعزل المباشر من تلك الكائنات، لكن إنتاجها باستعمال تقنية التخمير في الكائنات الدقيقة يعد أكثر جدوى من الناحية الاقتصادية.

رابعاً: استعمال التخمير في العمليات التحويلية

يمكن استعمال الكائنات الحية الدقيقة لتحويل مركبٍ ما إلى مركبٍ آخر مشابهٍ من حيث الصيغة لكنه أكثر أهميةً اقتصاديةً بالنسبة لنا (تحويل الكحول إلى خلٍ مثلاً). وتقوم الكائنات الحية الدقيقة بذلك من خلال إنزيماتها، ويمكن عزل تلك الإنزيمات واستعمالها في العمليات التحويلية في الوسط الزجاجي من دون الحاجة إلى الكائن الحي الدقيق، لكن الإنزيمات تعمل بشكلٍ أفضل عندما توجد داخل الكائنات الدقيقة، السيئة الوحيدة هي الحاجة إلى كميةٍ كبيرةٍ من الكتلة الحيوية لإنجاز تفاعلٍ واحدٍ.

تستطيع الكائنات الحية الدقيقة القيام بعددٍ كبيرٍ من العمليات التحويلية من مثل: تفاعلات الأكسدة والإرجاع، إضافة وحذف الزمر المختلفة (هيدروكسيل، كربوكسيل، أمين.....إلخ)، إضافة الماء وحذفه، التحويل إلى مماكبات (التحويل إلى الشكل الميمن أو الميسر ولذلك أهمية قصوى في الصناعة الدوائية).

خامساً: الحصول على نواتج التأشيب recombinant products

يمكن باستعمال تقنيات تأشيب وتنسيل الدنا أخذ مورثةٍ من كائنٍ حيٍ نباتيٍ أو حيوانيٍ وإدخالها إلى كائنٍ حيٍ دقيقٍ لنحصل بذلك على كائنٍ حيٍ دقيقٍ معدلٍ وراثياً وقادرٍ على إنتاج بروتيناتٍ مأشوبةٍ تعود بأصلها لتلك الكائنات الأعلى.

ومن أهم الكائنات الدقيقة المستعملة لإنتاج البروتينات المأشوبة: جراثيم الإشريكية القولونية *E. coli* والخمائر **Yeasts** وبعض أنواع الفطور ذات السياط **filamentous fungi**.

يوضح الجدول (1-2) أهم البروتينات المأشوبة التي يتم إنتاجها في كائناتٍ دقيقةٍ معدلةٍ وراثياً باستعمال تقنية التخمير.

انجاز التخمر :Fermentation processing

يطلق على الجهاز المستعمل لتنمية الكائنات الحية الدقيقة في شروط مضبوطة اسم المُخمّر **fermenter** أو المفاعل الحيوي **bioreactor** وتقسم العمليات الإنتاجية المتعلقة بالتخمير (الشكل 1-2) إلى ثلاث مراحل: عمليات ما قبل المخمر، المخمر وملحقاته، عمليات ما بعد المخمر.

الجدول 1-2: أهم البروتينات المأشوبة التي يتم إنتاجها باستعمال تقنية التخمير مع استعمالاتها.

البروتين	الاستعمال
تريبسين	معالجة الانتفاخ و عسر الهضم
عوامل الخلايا اللمفاوية B-cells	معالجة الاضطرابات المناعية
كالسيتونين	معالجة تلين العظام
غونادوتروبين	معالجة انقطاع الإباضة
اندورفين	تسكين الآلام
اريتروبويتين	حالات فقر الدم
عوامل التخثر VIII , XI	معالجة الناعور و النزاف
أنسولين	معالجة الداء السكري
إنترفيرونات	مكافحة الفيروسات و السرطان
ليمفوتوكسين	في الأورام السرطانية
ريلاكسين	تسهيل الولادة
ألبومين مصلي	تعويض بلاسما الدم
سوماتوميدين C	محرض للنمو
يوروغاسترون	معالجة القرحات الهضمية
يوروكيناز	حال للتجلطات

أولاً- بنية المُخمّر fermenter:

وهو جهازٌ أسطواني الشكل مصنوعٌ من معدنٍ خاملٍ (stainless steel)، ويوجد منه أحجامٌ مختلفةٌ تبدأ من 50 لتر (مخبري) وقد تصل حتى 100 ألف لتر (صناعي ضخم)، ويتكون جدار المخمر من جدار مضاعف double jacket وهو معزول حرارياً، ويضم المخمر عدداً من الأنظمة والتجهيزات الإضافية (الشكل 1-3) تتضمن:

1- نظام ضبط الحرارة: لاختيار درجة الحرارة المناسبة لنمو الكائنات الحية الدقيقة، أو للانتقال إلى الدرجة المناسبة للحصول على ناتج استقلاب محدد. ويتكون النظام من شبكة من أنابيب التسخين والتبريد يتحكم بها منظم حراري قابل للضبط.

2- نظام خلط وتحريك: الهدف منه مجانسة محتويات المخمر وتأمين التحريك المناسب لاسيما بالنسبة للكائنات الهوائية، ويضم محرك كهربائي يخرج منه ذراع طويلة مزودة باستطالات جانبية (تشبه الشفرات)، كما يوجد على السطح الداخلي لجسم المخمر حواجز عرضية لكسر التيارات الدورانية وتأمين خلط أفضل.

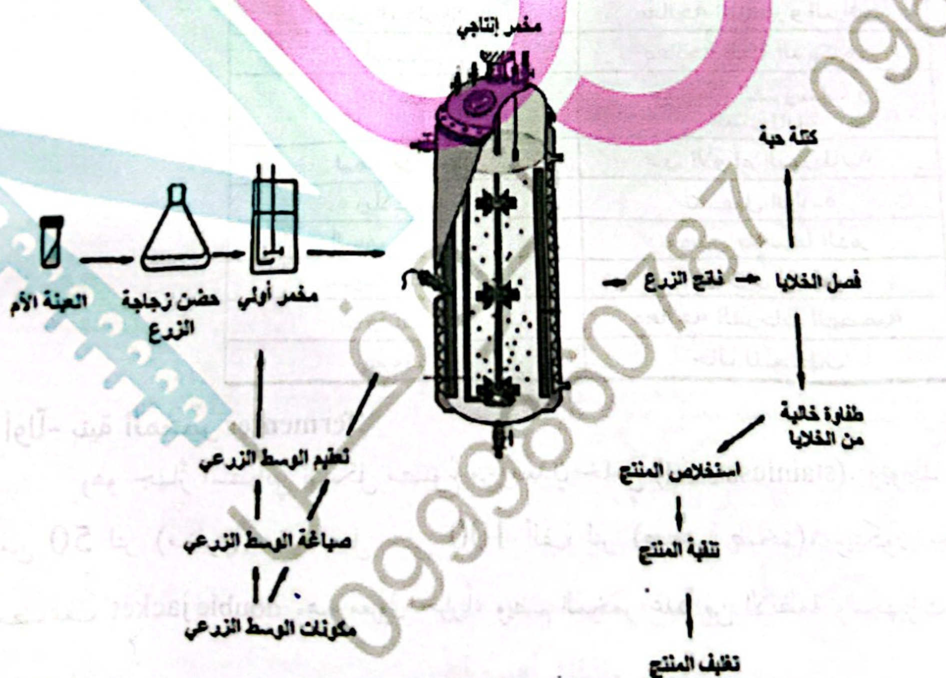
3- نظام توزيع الهواء: يتم من خلاله ضخ الهواء (العقيم) اللازم لنمو الكائنات الحية الدقيقة -إذا كانت هوائية- وهو عبارة عن أنبوب ينتهي بحلقة مثقبة تولد فقاعات هوائية داخل الوسط.

4- صمامات: تسمح بتفريغ الغازات الناتجة في أثناء التخمر ومنع احتباس الضغط داخل المخمر.

5- نظام مكافحة الرغوة defoaming system: يهدف إلى منع تولد رغوة كثيفة داخل المخمر ومن ثم منع خروج مكونات المستنبت من المخمر (منع حدوث فوران).

وتنتج الرغوة عن عوامل عدة من مثل: التحريك المستمر وعمليات التهوية المستمرة والغازات الناتجة عن نشاط الكائنات الدقيقة.

ويتكون نظام مكافحة الرغوة من مجسات استشعارٍ ضوئيةٍ تتحسس تشكل الرغوة وتعطي إشاراتٍ إلى ضاغطٍ عكسيٍ يولد ضغطاً على سطح الوسط السائل فيكبح بذلك تشكل الرغوة.



الشكل 1-2: مراحل عملية التخمر.

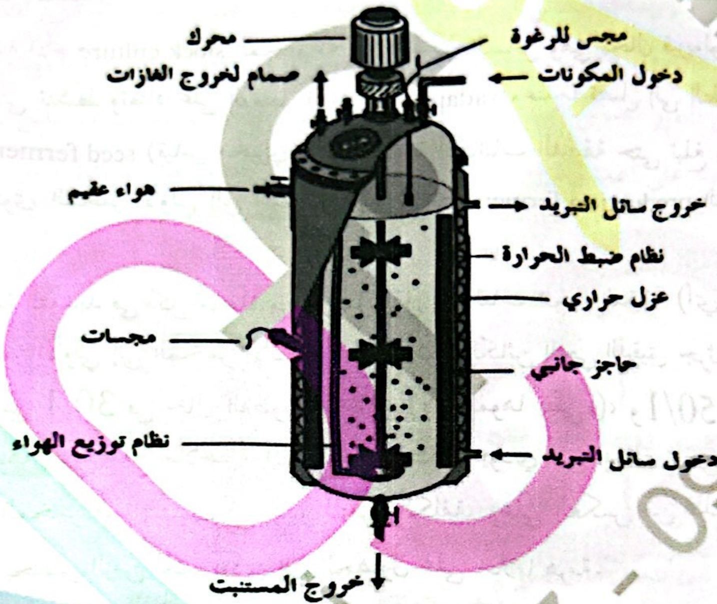
6- مجساتٍ متنوعةٍ sensors: لقياس ومراقبة أحوال المزرعة (درجة الحرارة، تركيز الأوكسجين، درجة الـ pH، كثافة الخلايا، تركيز المواد المغذية) وهي متصلة بحاسوب للتحكم بالمخمر.

7- أنظمة إدخال وإخراج: تسمح بإدخال مكونات الوسط الزرعي والمواد المغذية والركائز substrates وتسمح بأخذ العينات للمراقبة خلال التخمير أو تفريغ محتوى المخمر في نهاية الوجبة وإرساله إلى أجهزة الفصل والتنقية.

ملاحظة:

يجب مراعاة العقامة في المراحل كلها، فأي تلوث بكائن حي دقيق آخر ستكون له عواقب كارثية، وفي مايلي بعض الأمثلة:

1- في مخمر لإنتاج البنسلين أو السفالوسبورين، حدوث أي تلوث بكائن حي دقيق آخر ينتج أحد إنزيمات البيتالاكتاماز سيؤدي في النهاية إلى الحصول على منتج متخرب وفاقد الفعالية.

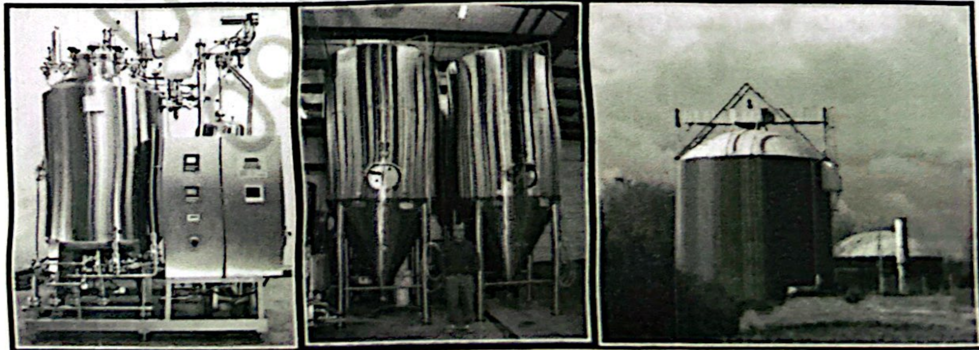


الشكل 1-3: مخطط يوضح بنية وملحقات المخمر.

2- قد ينتج عن التلوث مستقلبات غير مرغوب بها تصعب عمليات الفصل والتنقية اللاحقة.

3- التلوث بأحد الكائنات الدقيقة الممرضة سيؤدي إلى عواقب صحية وخيمة.

4- في أبسط الحالات سيستهلك أي كائن إضافي غير مرغوب به المواد المغذية ويضعف نمو الكائن المطلوب تنميته.



الشكل 1-4: أحجام مختلفة من المخمرات تبدأ بحوالي 50 لتر وتصل حتى مئات الآلاف من اللترات.

مثال:

ثانياً- عمليات ما قبل المخمر Upstream of fermenter

تنفذ غالبية عمليات ما قبل المخمر في المخبر وتشمل: تحضير الوسط الزرعي وتحضير اللقاحة البدئية.

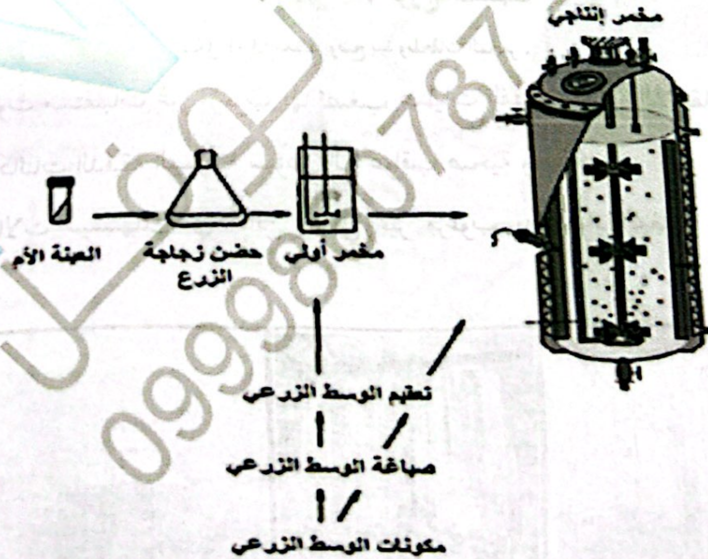
1- تحضير الوسط الزرعي:

يجب تطوير صيغة مناسبة للوسط الزرعي تؤمن النمو الأمثل للكائن الحي الدقيق وتقدم الركائز اللازمة والتي توجه نحو الاصطناع الحيوي لناتج الاستقلاب المطلوب إنتاجه. يعقم الوسط الزرعي بعد تحضيره بالحرارة الرطبة في الدرجة 120°م إما في المخمر أو في أجهزة مستقلة، ويعد تركيب الوسط الزرعي من الأسرار المهنية للشركة المصنعة.

2- تحضير اللقاحة البدئية:

تؤخذ العينة الأم stock culture المحفوظة في الآزوت السائل وهي بحال فيزيولوجية غير فعالة وتزرع في دورق مخبري حتى تنشط وتعتاد على الوسط الزرعي adaption، وعندما تصل إلى الطور اللوغارتمي تنقل إلى مخمر أولي seed fermenter (قياس مخبري)، تتابع تنمية الكائنات الدقيقة حتى تبلغ مجدداً الطور اللوغارتمي عندها ينقل محتوى المخمر الأولي إلى المخمر الإنتاجي production fermenter الحاوي على وسط زرعي جديد وعقيم.

تحدد نسبة التمديد في كل مرحلة من مراحل نقل الكائنات الحية الدقيقة (أي من الدورق إلى المخمر الأولي ومن المخمر الأولي إلى المخمر الإنتاجي) تبعاً لكون الكائن الحي الدقيق جرثومي أو فطري على النحو الآتي: 20/1 حتى 30/1 في حال الفطور والخمائر (لأن نموها بطيء)، و50/1 حتى 100/1 في حال الجراثيم (لأن نموها سريع) مع ملاحظة أن التمديد الشديد يؤدي إلى إطالة الزمن الذي تستغرقه الكائنات الدقيقة لاستعمار المخمر مما يتسبب في هدرٍ للزمن والكلفة، وعلى العكس من ذلك فإن استعمال تركيزٍ عالٍ من الكائن الدقيق يختصر الزمن لكنه يؤدي إلى الحصول على خلايا هرمة.



الشكل 1-5: مخطط يوضح عمليات ما قبل المخمر.

مثال:

في حال إنتاج البنسلين G باستعمال مزارع فطر البنسليوم إذا كان حجم المخمر الإنتاجي 10 آلاف لترٍ فإن ذلك يستوجب استعمال مخمرٍ أوليٍ بسعة 300-500 لترٍ ويكون الحجم المناسب للقاحة البدئية حوالي 10-25 لتراً.

ثالثاً- عمليات ما بعد المخمر downstream of fermenter

تهدف هذه المرحلة إلى فصل وتنقية المنتج المطلوب عن باقي مكونات المستنبت، حيث يجب أن نكون على علم تام بخواصه الفيزيائية والكيميائية، فبعد انتهاء عملية التخمير يتم نقل محتويات المزرعة إلى مرشحات أو أجهزة تثفيل لفصل خلايا الكائن عن الطور السائل cell separation، في حال كان هدفنا هو الكتلة الحيوية biomass أو إنزيمات الكائن أو بروتيناته الداخلية فيرمى عندها الطور السائل supernatant.

أما إذا كنا نريد الحصول على ناتج استقلابي يتم إفرازه إلى الوسط الزرعي كما في حال البنسلين G فترمى الكتلة الحية وينقل الطور السائل إلى قسم الفصل، حيث يمكن أن يتم ترسيب البنسلين G أو استخلاصه بمحلات كيميائية ثم تنقيته على أعمدة كروماتوغرافيا مناسبة وصولاً إلى ناتج عالي النقاوة.



الشكل 1-6: مخطط يوضح عمليات ما بعد المخمر.

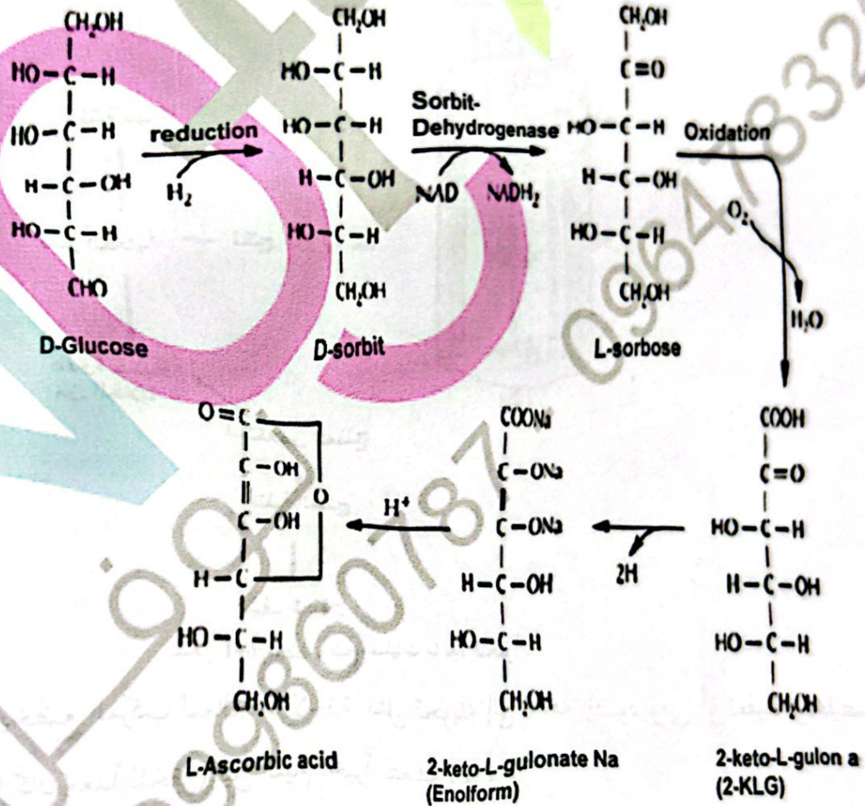
من الممكن أن يخضع المركب لمعالجات لاحقة مثل تحويله إلى ملحه الصوديومي أو تعقيمه وتخليصه من مولدات الحرارة (إذا كان معداً للحقن) قبل القيام أخيراً بتعبئته وتغليفه.

13

الفصل الثاني
إنتاج بعض المركبات المهمة باستعمال تقانة التخمير

أولاً- إنتاج الفيتامين C

يتضمن الاصطناع التقليدي (العضوي) للفيتامين c أو ما يعرف بـ L-ascorbic acid خمس مراحل تبدأ بالغلوكوز الميمن بوصفه مادة أولية (الشكل 1-7)، وهو طريق طويلٌ ومكلفٌ اقتصادياً ويؤدي في المرحلة الثالثة منه إلى الحصول على طليعة حمض الأسكوربيك المعروفة بـ (2-KLG).



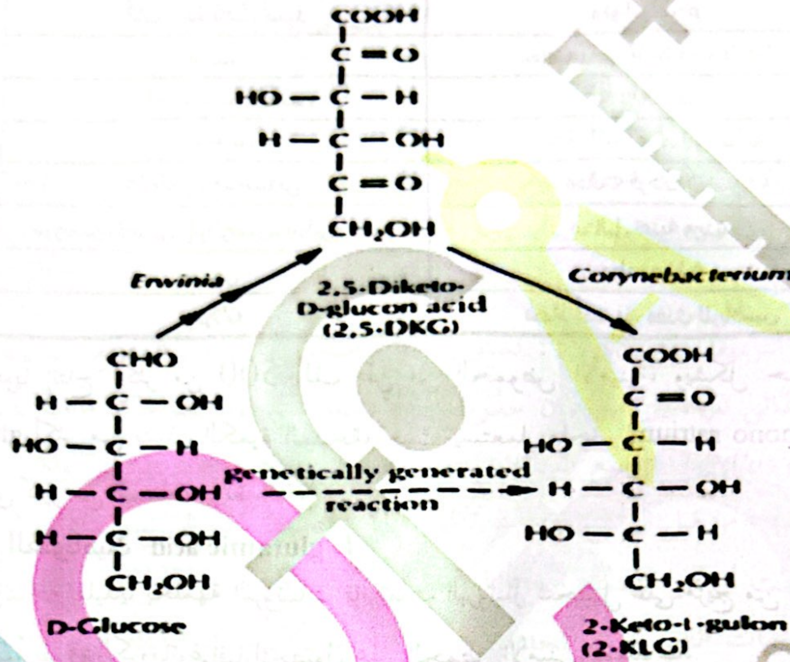
الشكل 1-7: طريق الاصطناع العضوي لحمض الأسكوربيك انطلاقاً من الغلوكوز.

يمكن باستعمال تقانة التخمير توفير ثلاث مراحل من الاصطناع العضوي والحصول مباشرة على مركب 2-KLG، ولتحقيق ذلك يمكن استعمال إحدى الطريقتين الآتيتين:

14

1- التخمير باستعمال نوعين من الكائنات الدقيقة:

يمكن تنمية نوعين من الجراثيم هما *Erwinia herbicola* و*Corynebacterium* بحضنهما معاً في المخمر في وسط غني بالغلوكوز كمصدر للكربون حيث يتم تحويل الغلوكوز إلى طليعة حمض الأسكوربيك 2-KLG وفق التفاعل الموضح في الشكل 1-8:



الشكل 1-8: إنتاج طليعة حمض الاسكوربيك باستعمال مزارع الكائنات الدقيقة.

يتم الاصطناع على مرحلتين: في المرحلة الأولى تقوم جراثيم *Erwinia herbicola* بتحويل الغلوكوز الميمن إلى مركب 2,5 –diketo-D-gulon acid والذي يشكل بدوره ركيزة لجراثيم *Corynebacterium* والتي تقوم في مرحلة ثانية بإرجاعه بوساطة إنزيم الريدكتاز محولةً إياه إلى طليعة حمض الأسكوربيك 2-KLG.

2- التخمير باستعمال كائن واحد معدل وراثياً:

إن زرع كائنين دقيقين في وسط زرعي واحد وفي الشروط نفسها قد يكون غير مناسب من الناحية التقنية، لذلك لجأ العلماء إلى تعديل جراثيم *Erwinia herbicola* بإدخال مورثة إنزيم الريدكتاز إليها، بحيث أصبحت السلالة المعدلة وراثياً قادرة على إنجاز كلتا مرحلتي الاصطناع بمفردها، أي للحصول على طليعة حمض الأسكوربيك يكفي زرع جراثيم *Erwinia herbicola* المعدلة وراثياً في وسط غني بالغلوكوز الميمن.

ثانياً- إنتاج الحموض الأمينية:

تملك الحموض الأمينية أهمية كبيرة من الناحية التطبيقية فهي:

1- تستعمل في الصناعات الغذائية كمقويات للطعم.

2- تدخل في الكثير من مستحضرات التجميل.

3- تستعمل في الصناعة الدوائية كصادات أكسدة أو محليات بديلة أو محاليل تغذية وريدية وتستعمل أيضاً في بعض المعالجات.

الجدول 1-3: يوضح الحموض الأمينية المهمة تطبيقياً مع استعمالاتها.

الحمض الأميني	الاستعمال
ألانين، غلوتاميك أسيد	مقويات للطعم
أرجنين	معالجة بعض الاضطرابات الكبدية
أسبارتيك أسيد،غليسين	صناعة المحليات
سيستئين	مضاد أكسدة، أمراض صدرية
غلوتامين، هيستيدين	معالجة قرحات الهضم
تيروسين، لوسين، إيزولوسين، برولين، فالين	محاليل تغذية وريدية
سيرين	مواد تجميلية
تريبتوفان	مضاد أكسدة، مغذي للرياضيين

يتم سنوياً إنتاج أكثر من 500 ألف طنٍ من الحموض الأمينية، ويشكل حمض الغلوتاميك -L glutamic acid أكثر من نصف الكمية المنتجة، حيث يستعمل ملحه glutamate mono natrium بوصفه مقوياً للطعم في كثير من المنتجات الغذائية.

إنتاج حمض الغلوتاميك L-glutamic acid

يمكن إنتاجه تقليدياً بحلمهة البروتينات بإنزيمات البروتياز فنحصل على مزيج من الحموض الأمينية التي يتم فصلها لاحقاً بطرق الكروماتوغرافيا للحصول على الحمض الأميني المطلوب.

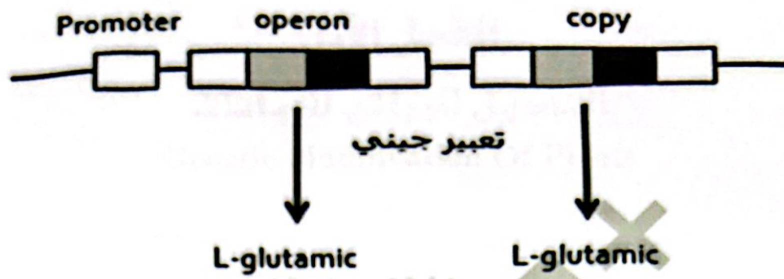
أما لإنتاجه بالتخمير فنستعمل مزارع جراثيم *Corynebacterium glutamicum*، حيث تنتج هذه السلالة حمض الغلوتاميك بصورة طبيعية فتنمو بذلك على أوساط خالية من حمض الغلوتاميك (صفة autotrophy).

وتم حديثاً تعديل هذه الجراثيم وراثياً لزيادة مردودها من حمض الغلوتاميك، حيث تضمن التعديل الوراثي نسخ المشغّل operon المسؤول عن الاصطناع الحيوي لحمض الغلوتاميك وتكراره أكثر من مرة تحت إشراف المحرض promotor ذاته، وبذلك يزداد إنتاج الإنزيمات المسؤولة عن الاصطناع الحيوي وتزداد كمية حمض الغلوتاميك الذي تنتجه الجراثيم.

ملاحظة:

المشغّل operon: مجموعة من المورثات تتوضع غالباً بشكل متجاور على مجين الكائن وترمز مجموعة من البروتينات/الإنزيمات تعمل معاً لإنتاج مركب محدد أو لإعطاء صفة ظاهرية معينة phenotype، في مثالنا هذا تعمل معاً لتصنيع حمض الغلوتاميك.

16



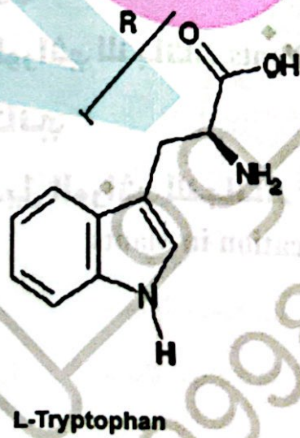
الشكل 1-9 : مبدأ التعديل الوراثي لجراثيم Corynebacterium glutamicum.

الفارق بين المنتجات المصنعة كيميائياً ومثيلاتها المنتجة باستعمال كائنات دقيقة معدلة وراثياً

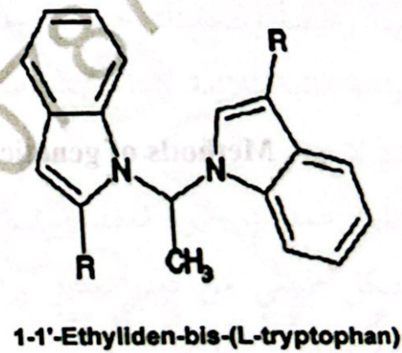
يلعب العامل الاقتصادي بالدرجة الأولى الدور الأساس في اختيار طريقة الإنتاج (كيميائية أو حيوية) شريطة تطابق النواتج في كلا الحالتين طبعاً، ولكن في بعض الحالات تحدد طريقة الاصطناع طبيعة النواتج الثانوية المرافقة (الشوائب).

مثال: حادثة التريبتوفان عام 1988: لسنواتٍ طوال استعمل التريبتوفان المصنع كيميائياً في الولايات المتحدة كمكمل غذائي للرياضيين من دون حدوث مشكلات، إلى أن قامت شركةٌ يابانيةٌ باستعمال جراثيم *Bacillus amyloliquefaciens* لتصنيع التريبتوفان بتقنية التخمير بشكل أرخص وأوفر، ولكن بعد طرحه في الأسواق الأمريكية وتناوله من قبل الرياضيين بدأت تظهر حالات تسمم أدت إلى تضرر حوالي 1500 شخص ووفاة 37 منهم، وشملت أعراض التسمم: ارتفاع الحامضات وآلام عضلية.

ولم تتمكن الجهات الصحية من تحديد الأسباب بدقةٍ بسبب قيام الشركة المصنعة بإتلاف السلالة الجرثومية ولكن بالعودة إلى المستحضرات المباعة وتحليلها تبين احتواؤها على مركبات ثانوية عدة أهمها -1,1̀ Ethyliden-bis-(L-tryptophan) والذي يعتقد أنه وراء حادثة التسمم.



L-Tryptophan



1-1'-Ethyliden-bis-(L-tryptophan)

الباب الثاني

استعمال التقانات الحيوية في مجال النباتات الطبية

Biotechnologies in Medicinal Plants

❖ **الفصل الأول**

التعديل الوراثي للنباتات Genetic Modification Of Plants

❖ **الفصل الثاني**

طرق التعديل الوراثي للنباتات

Methods of genetic modification in plants

18

الفصل الأول

التعديل الوراثي للنباتات

Genetic Modification Of Plants

مقدمة

تعرف النباتات المعدلة وراثياً transgenic plants بأنها النباتات التي أجري تعديل على مادتها الوراثية مهما كان صغيراً، فقد يشمل هذا التعديل مورثة أو أكثر ويتم تنفيذه بإحدى التقنيات الحيوية التي سنتطرق إليها في هذا الباب.

بدأ التعديل الوراثي للنباتات الطبية منذ منتصف السبعينيات من القرن الماضي، عندما لاحظ العلماء ظهور تورمات بشكل عقد galls على بعض النباتات سببتها إصابة بجراثيم *Agrobacterium tumefaciens* التي تغزو أماكن الجروح في النباتات وتؤدي إلى تغيير وراثي لخلايا النبات المصابة بالعدوى وبالنتيجة تشكل هذه الأورام، لاحقاً سخر العلماء هذه الجراثيم كأداة لإنتاج نباتات مُعدلّة وراثياً.

وتستعمل حالياً مزارع النباتات المُعدلة وراثياً لإنتاج المركبات الفعّالة، بسبب زيادة الطلب على المنتجات الحيوية ومحدودية التصنيع في الكائنات الحية الدقيقة باستعمال التخمير fermentation، حيث يحتاج إلى تجهيزات كثيرة وشروط تصنيع خاصة وتكلفة عالية.

إضافة إلى ذلك هناك ميزات لاستعمال النبات كعائل لتعبير المورثات نوجزها فيما يلي:

- يتقبل النبات مورثات غريبة من دون مشكلات.
- يمكن لخليةٍ نباتيةٍ واحدةٍ أن تعطي في أوساطٍ زرعيةٍ معينةٍ نباتاً كاملاً، وهذا ما يعرف بخاصية التجدد regeneration .
- يعد النبات مورداً رخيصاً ومتجدداً: حيث لا حاجة لوجود مبانٍ ومعداتٍ، فكل ما يلزم هو أرض زراعية والمتطلبات الزراعية ذاتها اللازمة لإنتاج المحاصيل العادية. ويمكن ابتداءً من نبتةٍ واحدةٍ مُعدلةٍ وراثياً أن نحصل على عددٍ لا نهائي من النباتات باستعمال طرق الإكثار اللاجنسي.
- يستطيع النبات إنجاز عملياتٍ حيويةً مُعقدةً مقارنة مع الكائنات الحية الدقيقة.
- ينتج النبات وبشكل طبيعيٍ من دون تعديلٍ وراثيٍ نواتج استقلاب ثانويةً ذات قيمةٍ دوائيةٍ (قلويدات، غليكوزيدات....وغيرها)
- النبات صديقٌ للبيئة.
- لا ينقل النبات عوامل ممرضةً للبشر، بينما قد يحدث انتقال لبعض العوامل الممرضة للإنسان عند اصطناع مواد دوائية في بعض الجراثيم أو في خلايا حيوانات مثل الفئران.

تحسين صفات النباتات باستعمال التهجين

قبل تطور طرق البيولوجيا الجزيئية كان تعديل الصفات الوراثية للنباتات يتم باستعمال التهجين من خلال مصالبة نباتات ذات صفات مختلفة ثم انتقاء الصفات الظاهرية المرغوبة، في هذه الحال يحدث انتقال لمئات المورثات في آن وليس تعديل لمورثة وحيدة كما في حال الطرق الحديثة، وتستند نتائج التهجين إلى قوانين ماندل وقوانين الإحصاء.

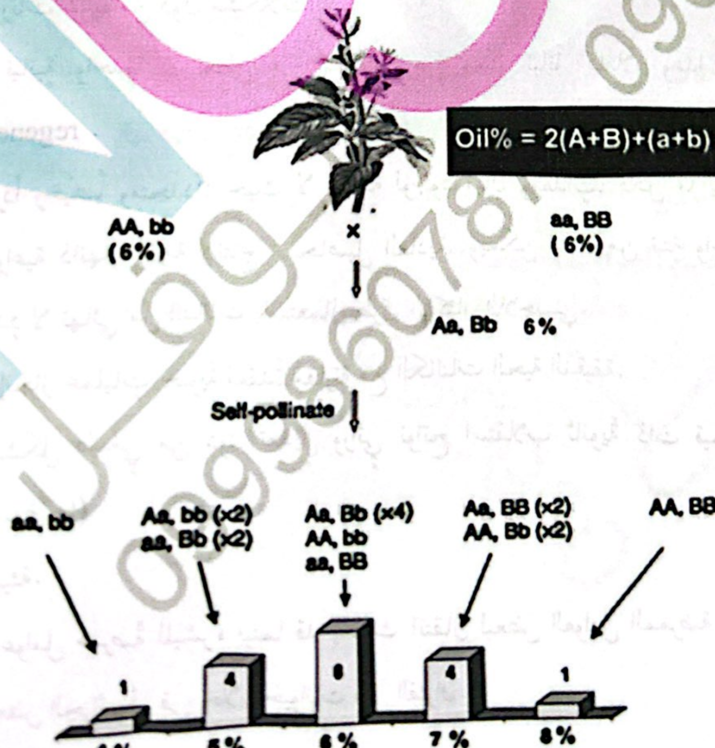
لتوضيح الفكرة سنضرب مثالاً عن زيادة نسبة الزيت الطيار في نبات النعناع الفلفلي من خلال مصالبة ذراري مختلفة منه:

يُستعمل نبات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* من الفصيلة الشفوية Lamiaceae لاستخلاص زيت النعناع والذي يحوي المنتول بوصفه مكوناً فعالاً، ولزيت النعناع والمنتول استعمالات طبية وصناعية واسعة، لذلك كان من المهم تحسين جودة نبات النعناع وزيادة نسبة الزيت فيه.

تتحكم مورثتان بنسبة الزيت في نبات النعناع الفلفلي يرمز لهما بالحرفين الكبيرين A, B إذا كانتا سائدتين وبالحرفين الصغيرين a, b عندما تكونان متنحيتين. وتتعلق نسبة الزيت الطيار في نبات النعناع بعدد المورثات السائدة فيه وتحسب باستعمال العلاقة:

$$Oil\% = 2(A+B) + (a+b)$$

نسبة الزيت % = 2(عدد المورثات السائدة) + (عدد المورثات المتنحية) فالنبات الذي يملك النمط الوراثي Aa, Bb تكون نسبة الزيت فيه =2(2)+2= 6%.



الشكل 2-1: زيادة نسبة الزيت الطيار في نبات النعناع الفلفلي من خلال مصالبة ذراري مختلفة منه.

20

في الشكل 2-1 عند إجراء مصالبة بين نباتين نسبة الزيت في كل منهما 6%، نحصل على نمط وراثي واحد Aa Bb نسبة الزيت فيه 6% على الرغم من اختلاف النمط الوراثي لكل من النباتين الأبويين.

بعد إجراء إلقاح ذاتي self pollination للنبات الناتج نحصل على خمسة أنماط وراثية محتملة تملك نسباً مختلفةً من الزيت الطيار، أحدها هو النمط AA,BB الذي يحوي أعلى نسبة زيت طيار ممكنة (8%) حيث يتم اعتماده وزراعته لإنتاج زيت النعناع الفلفلي.

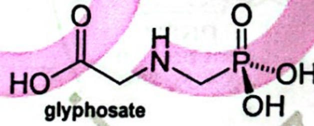
أهم الصفات النباتية التي يمكن تعديلها وراثياً:

إن أي صفة نباتية trait غالباً ما يتحكم بها أكثر من مورثة تتعاون معاً للتعبير عن هذه الصفة، لكن مع ذلك يوجد الكثير من الصفات المرمَّزة بمورثة وحيدة، ومعظم النباتات المعدلة وراثياً المعروفة حالياً تم إنتاجها من خلال تغيير مورثة وحيدة أو عدد قليل من المورثات.

1- زيادة قدرة النبات على مقاومة المبيدات العشبية:

يجب أن تؤثر المبيدات العشبية herbicides نظرياً على الأعشاب الضارة فقط من دون أن تضر بنباتات المحاصيل، إلا أنها في الغالب ذات اصطفائية غير عالية وتلحق ضرراً بنباتات المحاصيل، لذلك كان من المفيد تحسين قدرة النباتات على مقاومة المبيدات العشبية.

يؤثر المبيد العشبي glyphosate في الأعشاب الضارة من خلال تثبيط الإنزيم 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetas (EPSPS) الذي يتوسط اصطناع الحموض الأمينية العطرية (تربتوفان – فينيل ألانين – تيروزين) ونظراً لأن نباتات المحاصيل تصنع الحموض الأمينية العطرية بآلية مشابهة، لذلك فهي تتأثر أيضاً بالمبيد العشبي.



تملك بعض جراثيم التربة نسخة معدلة من إنزيم EPSPS تقوم بالوظيفة نفسها لكنها لا تتأثر بالglyphosate. لزيادة قدرة نباتات المحاصيل على مقاومة الglyphosate نقوم بنسخ مورثة الإنزيم EPSPS من جراثيم التربة وإدخالها إلى نباتات المحاصيل (الذرة مثلاً) لنحصل على نبات مُقاوم للمبيد العشبي glyphosate لأن الأنزيم في النبات المُعدل سيكون مصدره جرثومي ولا يتأثر بالنتيجة بالمبيد العشبي.

2- زيادة قدرة النبات على مقاومة الحشرات:

تشكل الحشرات تهديداً حقيقياً لنباتات المحاصيل وللنباتات الطبية وتسبب خسائر فادحةً في كمية وجودة النباتات المزروعة، ويمكن زيادة مقدرة النباتات المزروعة على مقاومة الحشرات من خلال تزويد النبات بمورثةٍ مسؤولةٍ عن إنتاج إنزيماتٍ تلحق ضرراً بالحشرة البالغة أو بإحدى مراحل دورة حياتها.

مثال: إنزيم كيتيناز chitinase غير موجودٍ في النبات بشكلٍ طبيعي، عند إدخال مورثة هذا الإنزيم إلى النبات بالتعديل الوراثي، يصبح النبات قادراً على إنتاج هذا الإنزيم في أجزائه الهوائية مثلاً، وعندما تحاول الحشرات أو يرقاتها قضم أجزاء النبات فإن إنزيم الكيتيناز سيقوم بتفكيك الهيكل الكيتيني للحشرة مسبباً موتها.

21

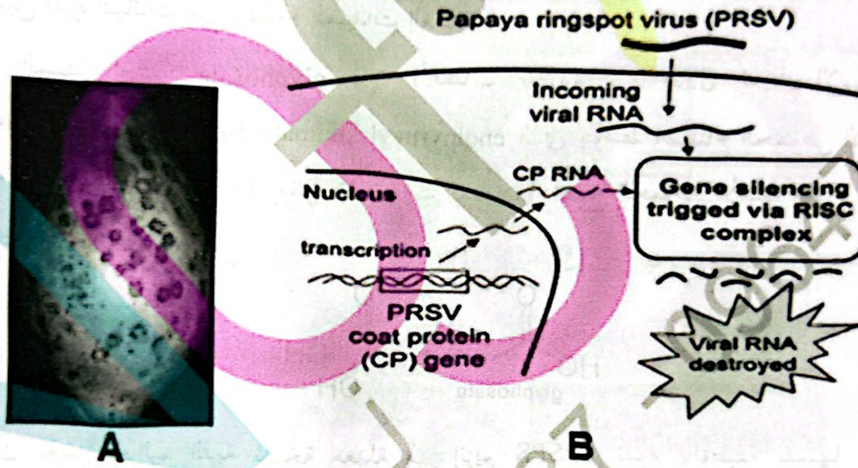
3- زيادة قدرة النبات على مُقاومة العوامل الممرضة

تصيب الكثير من الفيروسات والفطريات نباتات المحاصيل والنباتات الطبية وتلحق أضراراً بالغةً بها، وتعتمد المعالجات التقليدية على رش النباتات بالمضادات الفطرية أو الفيروسية، لكن حالياً يتم تطوير تقنيات حيوية جديدة لوقاية النبات وتمنيعه ضد هذه العوامل الممرضة.

ونعرض في المثال الآتي تطبيقاً يتم من خلاله تعديل النباتات لتمنيعها ضد الإصابة بفيروس PRSV (Papaya Ring Spot Virus)، وهو فيروس يصيب ثمار البابايا ونباتات أخرى من الفصيلة القرعية، ويسبب ظهور بقع دائرية أو حلقية على ثمار النبات (انظر الشكل 2-2).

مثل معظم الفيروسات يهاجم فيروس (PRSV) الخلايا النباتية ويحقن بداخلها مادته الوراثية والتي تندمج لاحقاً مع مجين الخلية لتقوم الخلية بإنتاج مكونات الفيروس.

لزيادة قدرة النبات على المقاومة نقوم بتلقيح النبات وذلك بإعطائه المورثات المسؤولة عن اصطناع الغلاف البروتيني للفيروس coat protein (cp)، فعندما يتعرض النبات الملقح لهجوم الفيروس ويحقن الفيروس مادته الوراثية (رنا) يتم مباشرة تعبئة الرنا الفيروسي في الغلاف البروتيني بدلاً من دخوله إلى مجين الخلية المضيفة، حيث تقوم الخلية بعد ذلك بتحليل المحافظ المتشكلة بما تحويه من الرنا الفيروسي.



الشكل 2-2: A: ثمار البابايا المصابة بفيروس PRSV، B: آلية تمنيع النباتات ضد فيروس PRSV.

4- تحسين القيمة الغذائية للمحاصيل

مثال على ذلك إنتاج الرز الذهبي: حيث أعلن عن إنتاجه في العام 2000 من قبل الباحثين Beyer & Potrykus وذلك من خلال إدخال المورثات الثلاثة المسؤولة عن اصطناع بيتا-كاروتين (أي المسار الحيوي الكامل) إلى نبات الرز. إذ يعد البيتا-كاروتين طليعة للفيتامين A، والذي يسبب عوزه مشكلات عدة منها جفاف العين Xerophthalmia وضعف الرؤية الذي قد يصل إلى حد العمى blindness، حيث عد إنتاج الرز الذهبي مفيداً بشكل خاص للبلدان الفقيرة التي تعتمد في غذائها على الرز.

5- تعديل زيوت النباتات

تدخل الزيوت النباتية في الصناعات الغذائية والتجميلية والدوائية ويمكن باستعمال تقنيات التعديل الوراثي للنباتات: زيادة مردود الزيت أو تحسين مواصفاته من حيث طبيعة أو نسبة المواد الداخلة في تركيبه.

22

استعمال النبات بوصفه عائلاً لإنتاج المواد الفعالة دوائياً

تنتج النباتات الطبية بشكل طبيعي مواد فعالة وهي غالباً نواتج استقلاب ثانوية (صابونينات، قلويدات، غليكوزيدات، أنترانوئيدات، مواد مرة، مواد لعابية.......) ويمكن التدخل وراثياً إما لزيادة المردود من المواد الفعالة أو لتحسين صفاتها وجودتها.

إضافة إلى نواتج الاستقلاب الثانوية يمكن استعمال النبات كعائل لإنتاج بروتينات حيوانية الأصل وذلك بإدخال المورثات المرمّزة لتلك البروتينات إلى النبات باستعمال إحدى طرق التعديل الوراثي ، وفيما يلي بعض تلك التطبيقات:

أولاً- إنتاج نباتات تحوي لقاحات vaccines:

يعد النبات عائلاً مناسباً لإنتاج اللقاحات لاسيما تلك التي تعطى فموياً مع الانتباه إلى تناول النبات الحاوي على اللقاح بشكله الغض (من دون طهي) لمنع تخرب اللقاح بحرارة الطهي، وتتميز هذه اللقاحات عن اللقاحات التقليدية ب:

1- انخفاض تكلفة الإنتاج فكل ما يلزم هو متطلبات الزراعة العادية من أرض وبذار وتسميد...وغيرها.

2- سهولة التخزين والحفظ: لا تحتاج إلى تبريد لحفظها بينما تحتاج اللقاحات التقليدية إلى الحفظ في درجات حرارة منخفضة (برادات).

3- سهولة الإعطاء للمريض، لاسيما للأطفال حيث يتقبلها المريض بشكل أكبر.

مثال : الموز الحاوي على مستضدات شلل الأطفال.

الصعوبات التي تواجه اللقاحات النباتية:

بالرغم من المزايا السابقة الذكر التي تتمتع بها النباتات بوصفها عائلاً لإنتاج اللقاح إلا أن هناك بعض العقبات مثل:

1- صعوبة ضبط الجرعة وتواترها (تحديد عدد الثمار التي يجب تناولها الفرد ومدة تكرارها) ويحتاج ذلك إلى إجراء دراسات سريرية.

2- التأكد من فعالية البروتين في الثمرة وقدرته على توليد المناعة.

ثانياً- إنتاج نباتات تحوي أضداد:

الأضداد هي معقدات بروتينية تنتجها الفقاريات (أي لا تنتج في النباتات الطبيعية) ويتكون الضد من سلاسل بروتينية عدة (كل سلسلة منها ترمّزها مورثة مستقلة) فعندما نقوم بإدخال مجموعة المورثات هذه إلى أحد النباتات، نحصل على نبات قادر على إنتاج الأضداد والتي لا يستفيد منها النبات بحد ذاته، لكن يستعمل الإنسان هذا النبات لعزل الأضداد بدلاً من إنتاجها في حيوانات التجربة كالفئران والأرانب وغيرها.

مثال: إنتاج نبات تبغ معدل وراثياً قادر على اصطناع أضداد لجراثيم المكورات العقدية *Streptococcus*، يمكن استعمال خلاصة هذا النبات لإضافتها إلى معاجين الأسنان أو الغسولات الفموية للقضاء على جراثيم *Streptococcus* التي توجد في تجويف الفم وعلى أسطح الأسنان.

مخاطر استعمال النباتات المعدلة وراثياً لإنتاج المواد الدوائية :

توجد بعض المخاطر المحتملة من جراء الاعتماد على النباتات المعدلة وراثياً لإنتاج المواد الدوائية نذكر فيما يلي بعضها:

1- هناك احتمال لحدوث تلوث متصالب بين النباتات المعدلة وراثياً والنباتات الطبيعية من النوع نفسه، خاصة إذا كانت مزروعة في حقول متجاورة وكانت غيرية التلقيح، فقد يحدث انتقال لحبوب الطلع بوساطة الحشرات أو الهواء من حقل إلى حقل مجاور.

مثال: شركة تقنيات حيوية تزرع رزاً معدلاً وراثياً يحوي مادة دوائية فعالة في حقل مجاور لحقول أخرى تنتج رزاً لأغراض غذائية، فهناك احتمال كبير لتلوث رز الطعام بهذا الرز المنتج للمواد الدوائية.

2- تحمل المواد الدوائية ولاسيما البروتينية منها بصمة النبات المنتج لها، نتيجة التعديلات الحاصلة بعد الترجمة أي بعد تصنيع البروتينPost-translational modification، من هذه التعديلات إضافة بعض الزمر السكرية للبروتين لنحصل على غليكوبروتين، قد تؤدي إضافة مثل هذه السكاكر إلى:

أ- تحريض الجهاز المناعي للبشر (حساسية)

ب- تغيّر فعالية البروتين إما بالزيادة أو النقصان.

مثال: استعمال نبات القمح لإنتاج بروتينات دوائية، في هذه الحال قد يتحسس بعض الأشخاص الذين يعانون أصلاً من حساسية تجاه بعض بروتينات القمح (كالغلوتين).

24

الفصل الثاني

طرق التعديل الوراثي للنباتات

Methods of genetic modification in plants

يعتمد التعديل الوراثي للخلايا على إدخال مورثة أو أكثر إلى مجين الخلية النباتية DNA delivery وتسمى هذه العملية اصطلاحاً بالاستحالة النباتية Plant transformation وبعكس الخلايا الجرثومية أو الحيوانية لا تتم الاستحالة بسهولة في النبات بسبب وجود جدار سلولوزي ثخين، مما يتطلب استعمال تقنيات خاصة للتغلب على هذه المشكلة ونوجز فيما يلي أهم الطرق المستعملة لتعديل النباتات وراثياً.

أولاً- استعمال جراثيم الأجرعية لتعديل النبات وراثياً:

تعيش جراثيم الأجرعية *Agrobacterium tumefaciens* في التربة وتهاجم النباتات المصابة بجروح أو شقوق لاسيما في الجزء السفلي من ساقها القريب من التربة مسببة لها خمجاً يؤدي إلى تطور ورم نباتي على شكل عقدة gall.

بدراسة هذه الجراثيم تبين أنها تحوي بالإضافة إلى مجينها على بلاسميد سمي بالبلاسميد المحرض للورم tumor induction plasmid واختصاراً Ti-plasmid (الشكل 2-3) نلاحظ من الشكل أن البلاسميد يحوي العناصر الوراثية الآتية:

1- origin of replication: وهي نقطة أصل التضاعف في جراثيم الأجرعية.

2- *vir* genes: وهي مورثات ترمّز الفوعة الجرثومية.

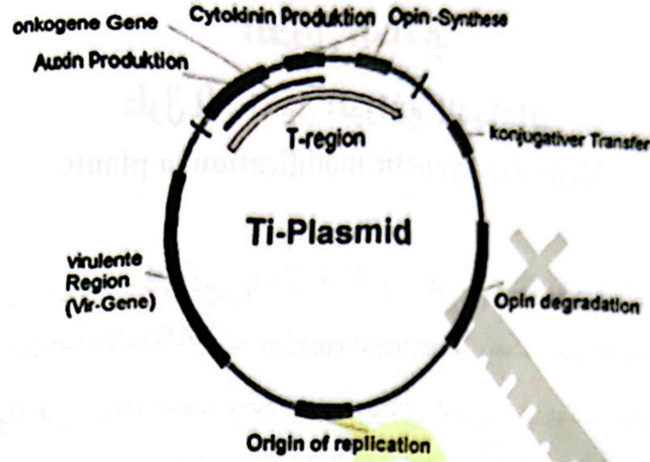
3- T-region: وهي المنطقة الناقلة التي يقوم الجرثوم بحقنها داخل الخلايا النباتية التي يخمجها، حيث تدخل هذه القطعة من البلاسميد إلى نواة الخلية المصابة وتندمج مع مجينها، مما يحرض الخلية المصابة على إنتاج البروتينات المرمّزة على هذه المنطقة وهي:

أ- مورثات إنتاج الـ opines وهي مواد عضوية آزوتية تشكل غذاء مهماً للجرثوم، وهي هدف الجرثوم الذي يرغب في الحصول عليه من خلال غزوه لخلايا النبات المصاب.

ب- مورثات ورمية onco genes وهي مورثات ورمية ترمز إنتاج هرمونات نمو نباتية (الأوكسينات والسيتوكينينات) تؤدي إلى نمو غير مضبوط للخلايا النباتية المصابة مشكلة ورماً gall منتجاً للأوبين الذي يحتاجه الجرثوم، وبذلك يكون الجرثوم قد جعل من الخلايا النباتية المصابة مصنعاً لتوليد غذائه، وعند نزول المطر يحدث انجراف للأوبينات من الكتلة الورمية إلى التربة حيث تعيش جراثيم الأجرعية.

4- مورثات تفكك الأوبين opin degradation genes وهي مورثات مسؤولة عن تحليل مادة الأوبين للحصول على الآزوت العضوي منها، تبقى هذه المورثات في خلايا الجراثيم ولا تنتقل إلى خلايا النبات.

25



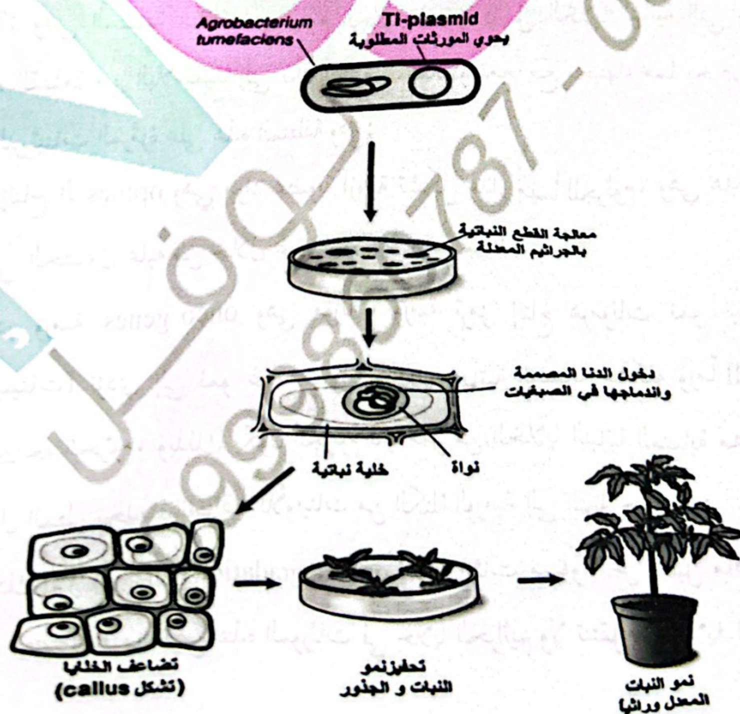
الشكل 2–3: بنية البلاسميد المحرض للورم **Ti-plasmid** الموجود في جراثيم الأجرعية ***Agrobacterium tumefaciens***

كنتيجة نهائية فإن هذه الجراثيم تقوم بعملية تعديل وراثي لخلايا النبات من خلال إدخال الـ T-region إليها وجعلها مصنعاً لتوليد الأوبينات التي تعتمد عليها الجراثيم في غذائها.

التعديل الوراثي لنبات التبغ باستعمال جراثيم الأجرعية :

استفاد العلماء من فهم آلية عمل جراثيم الأجرعية *A. tumefaciens* في تعديل النباتات، حيث قاموا بتطويع هذه الجراثيم واستعمالها بوصفها أداة مهمة لإدخال مورثات ترمز بروتينات ذات قيمة دوائية واقتصادية إلى بعض النباتات مثل نبات التبغ وذلك وفقاً للمراحل الآتية:

- عزل الـ Ti-plasmid من الجراثيم وإجراء بعض التعديلات عليه تتضمن: حذف المورثات الورمية ومورثات اصطناع الأوبين وإدخال مورثات اصطناع البروتين المطلوب أو المادة الدوائية المطلوبة.
- إدخال البلاسميد المعدّل إلى جراثيم الأجرعية باستعمال تقنية الاستحالة transformation.



الشكل 2–4: التعديل الوراثي للنبات باستعمال جراثيم الأجرعية ***A. tumefaciens***

26

- حضن قطعٍ من أوراق نبات التبغ في وسطٍ مغذٍ مناسبٍ لنمو النباتات أضيف إليه معلق الجراثيم الحاوية على البلاسميد المعدَّل. حيث تهاجم الجراثيم الخلايا النباتية وتحقن البلاسميد بداخلها، تتكاثر الخلايا المحقونة بالبلاسميد في الوسط المغذي لتعطي كتلة خلوية غير متمايزة تدعى الكالوس callus.
- تُنقل الكتلة إلى وسطٍ حاوٍ على هرموناتٍ تحرض تشكل الساق والجذور.
- تُنقل النباتات الصغيرة المتشكلة إلى التربة لتنمو إلى نبات بالغ يحوي في خلاياه البروتين الهدف أو المادة الفعالة المرغوبة.

ثانياً- استعمال الأسلحة الجينية gene guns:

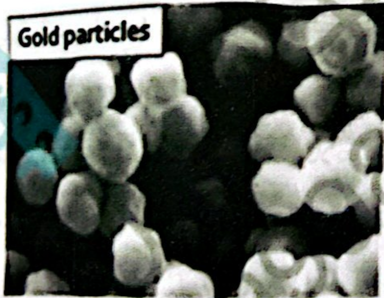
وهي طريقة فيزيائية ميكانيكية بحتة، تعتمد على استعمال كرات من معدن خامل (ذهب أو بلاتين أو تنغستن) قطرها حوالي 1ميكرومتر، ملبسة بطبقة من الدنا المراد إدخاله إلى الخلية، حيث يتم إطلاق هذه الكرات الدقيقة على خلايا النبات المراد تعديله وراثياً.

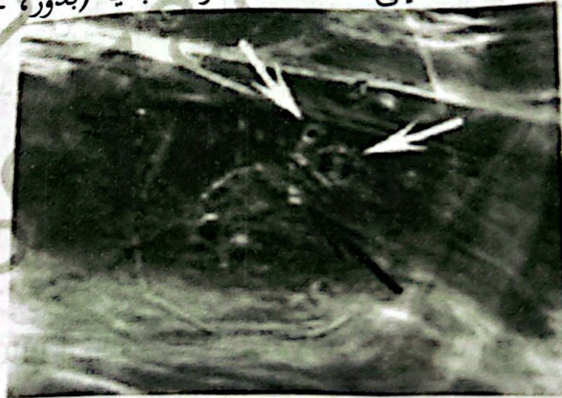
- لتلبيس الكرات بالدنا: توضع الكرات المعدنية في محلول فوسفاتي لجزيئات الدنا ثم يضاف محلول كلوريد الكالسيوم فيتشكل معقد من فوسفات الكالسيوم للدنا والذي يترسب على أسطح الكرات المعدنية، ويمكن أيضاً ترسيب الدنا على سطح المعدن بإضافة الإيتانول بنسبة 70-80% فيترسب الدنا على أسطح الكرات حيث يمكن رفع الكرات و تبخير الإيتانول فيبقى الدنا ملتصقاً على أسطح الكرات.
- قذف الكرات الدقيقة على الخلايا النباتية: ويتم القذف بتسريع الكرات في حقل كهربائي أو بتأثير ضغط غازي (باستعمال غاز خامل مثل النتروجين أو الهليوم أو CO_2)، تخترق الكرات الخلية النباتية وتستقر بداخلها، حيث ينحل الدنا الموجود على أسطح الكرات في السوائل الخلوية ليتم نقله بعد ذلك إلى نواة الخلية.

ميزات التقنية :

تتمتع تقنية الأسلحة الجينية بعدد من الميزات:

1- إمكانية إدخال الدنا إلى مختلف الأجزاء النباتية (بذور، حبوب طلع، نباتات منتشة).





الشكل 2-5: استعمال الأسلحة الجينية لتعديل النباتات وراثياً.

2- تعد الأسلحة الجينية الطريقة الوحيدة لإدخال الدنا إلى الصانعات الخضراء chloroplasts أو المتقدرات mitochondria (تحوي الصانعات الخضراء والمتقدرات دنا خاص بها، مستقل عن مجين الخلية).

3- إمكانية عمل cotransformation: أي إدخال أكثر من بلاسميد إلى داخل الخلية في آن، وذلك باستعمال كرات مُلبسة ببلاسميدات مختلفة.

مساوئ التقنية:

أبرز سيئة هي ضعف تكرارية التجارب، أي أننا نحصل على نتائج مختلفة من تجربة إلى أخرى، لأن دخول الدنا واندماجه في مجين الخلية يعتمد في هذه التقنية على الصدفة، فقد يحدث دخول لكامل الدنا أو قد يتضرر جزء من الدنا ويدخل ما تبقى منه سليماً، حتى بعد دخول الدنا فقد يختلف مكان اندماج الدنا في مجين الخلية في كل مرة تعاد فيها التجربة، وينتج عن ذلك كله الحصول على نماذج مختلفة لأنماط اندماج الدنا DNA-Integration patterns.

ثالثاً- استعمال الأشكال الأولية Protoplasts:

الأشكال الأولية هي خلايا نباتية فاقدة الجدار السيلولوزي، حيث تتم إزالته بطريقة أنزيمية، بمعالجة خلايا العينة بإنزيمي cellulase وpectinase اللذان يحللان الجدار الخلوي مع المحافظة على الغشاء السيتوبلاسمي فتنتج لدينا خلايا حساسة جداً، يمكن الحفاظ عليها ضمن محلول مغذي مناسب الضغط الحلولي، ويستعمل عادةً سكر المانيتول أو السوربيتول لهذا الغرض.



الشكل 2-6: تحضير الأشكال الأولية من خلايا أوراق نباتية.

التعديل الوراثي للأشكال الأولية:

بتحضير الأشكال الأولية نكون قد تخلصنا من الجدار السلولوزي الذي يميز الخلية النباتية ويجعل تحويلها وراثياً أمراً صعباً، بعد ذلك يمكن إتباع إحدى الطرق الآتية:

1- الاندماج الخلوي Cell fusion:

الاندماج الخلوي عملية معاكسة للانقسام الخلوي، ويمكن دمج الأشكال الأولية لنباتين مختلفين بوضعهما معاً في وسط مناسب ثم تحريض الاندماج الخلوي بطرق عدة تتضمن: تعريض الأشكال الأولية لنبضات كهربائية أو إضافة البولي إيثيلين غليكول PEG أو التعريض لأشعة UV. ويحدث بعد ذلك تكامل بين خلايا النباتين ونحصل على خلية هجينة، يمكن تنميتها في أوساط زرعية مناسبة لتعطي نباتاً كاملاً يكون هجيناً من كلا النوعين النباتيين الأصليين.

مثال: الحصول على النبات الهجين Broccoflower من الاندماج الخلوي للأشكال الأولية لكلٍ من نباتي البروكولي Broccoli ونبات القرنبيط Cauliflower.

2- الحقن المجهري Microinjection

يتم حقن محلول الدنا المراد إدخاله في الأشكال الأولية للخلايا النباتية تحت المجهر باستعمال جهاز التعديل المجهري micromanipulator.

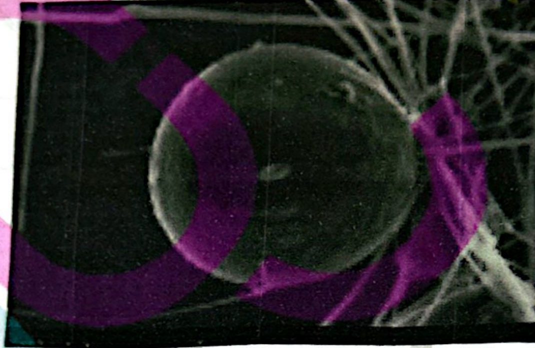
ملاحظة: لا يمكن استعمال هذه التقنية لحقن الخلايا النباتية سليمة الجدار الخلوي بسبب تحطم رأس المحقن الدقيق على الجدار السلولوزي الصلب.

3- التثقيب الكهربائي Electroporation

تعتمد هذه التقنية على وضع الأشكال الأولية في وسطٍ مناسبٍ أضيف إليه محلول الدنا المراد إدخاله ثم تعريضها لحقلٍ كهربائي لمدةٍ زمنيةٍ قصيرةٍ (أجزاء من الثانية) تؤدي إلى تشكل ثغراتٍ مؤقتةٍ تضمن دخول الدنا إلى داخل الأشكال الأولية.

رابعاً- استعمال أشعار كربيد السيليكون Silicon carbide Whiskers

أُستعملت هذه الطريقة في البداية لتعديل بيوض الحشرات وطورت لاحقاً لتعديل الخلايا النباتية. الأشعار المستعملة هي بلوراتٌ أبريةٌ حادةٌ من مادة كربيد السيليكون، لا يتجاوز قطرها 1 ميكرومتر وطولها 20 ميكرومتر، وهي قاسيةٌ لدرجةٍ تمكنها من ثقب جدار الخلية السلولوزي من دون أن تنكسر.



الشكل 2-7: أشعار كربيد السيليكون وهي تثقب بيضة حشرة.

توضع الخلايا النباتية في أنبوب اختبار يحوي محلول الدنا المراد إدخاله إلى الخلايا وتضاف إليها أشعار كربيد السيليكون ثم تعرض للرج باستعمال جهاز vortex، يؤدي الاهتزاز إلى اختراق الأشعار لجدار الخلية وإحداث ثقوب تسمح بدخول الدنا.

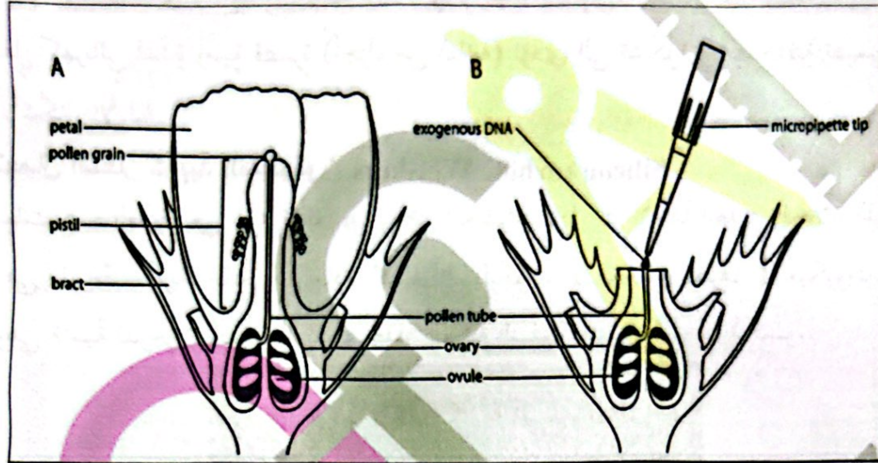
من سيئات هذه الطريقة مردودها الضعيف، حيث يموت جزءٌ من خلايا العينة ويحدث تعديلٌ وراثيٌ فعليٌ لـ 1-2% من خلايا العينة، لذا من الضروري جداً إيجاد طريقةٍ لانتقاء selection الخلايا المعدلة وراثياً وعزلها عن باقي خلايا العينة.

يتم الانتقاء عادةً من خلال إضافة واصمةٍ انتقائيةٍ selection marker إلى الدنا المراد إدخاله، وعادةً ما تكون الواصمة مورثةً ترمز القدرة على مقاومة مبيدٍ عشبيٍ محددٍ. وبعد إجراء التعديل الوراثي باستعمال أشعار

كربيد السيليكون، تنمى الخلايا في مستنبت أضيف إليه المبيد العشبي herbicide الموافق فتنجو فقط الخلايا التي أخذت الدنا المراد إدخاله.

خامساً- طريقة الأنبوب الطلعي Pollen tube pathway

ينشأ عن حبة الطلع في أثناء الإلقاح أنبوب طلعي (قناة إلقاح) يمتد بداخل القلم حتى يبلغ المبيض، حيث توجد البويضات. ويمكن الاعتماد على هذا الأنبوب لإجراء تعديل وراثي للبذور المتشكلة، حيث يتم قطع القلم بعد الإلقاح مباشرة أي بعد مرور الأمشاج الذكرية وقبل انغلاق الأنبوب الطلعي (التوقيت مهم جداً).



الشكل 2-8: تعديل بذور النبات وراثياً باستعمال الأنبوب الطلعي.

توضع نقاط عدة من محلول جزيئات الدنا المراد تعديل البذور به على سطح مكان القطع، مما يؤدي سحب المحلول إلى داخل المبيض بالخاصة الشعرية وولوجه إلى داخل البيضة الملقحة المتشكلة للتو، مما يؤدي إلى تطور بذرةٍ معدلةٍ وراثياً.

اختيار النبات المناسب لإنتاج البروتينات العلاجية:

يمكن استعمال تنوع هائل من النباتات كعائلٍ لاصطناع البروتينات ذات القيمة العلاجية، فقد يكون النبات متجانس الخلايا (مكون من نوع واحد من الخلايا) أو متغاير، أرضي أو مائي، غذائي أو غير غذائي، ورقي أو ثمري... وغيرها.

هناك مجموعة من العوامل يجب على الباحث مراعاتها عند اختيار العائل المناسب وهي:

- حجم الجزء النباتي المنتج للمادة الدوائية، فعند إنتاج لقاحٍ ما في ثمرة النبات، ينبغي أن يكون مردود النبات من الثمار جيداً لكي يكون الإنتاج مجدياً من الناحية الاقتصادية، والشيء ذاته ينطبق على باقي الأجزاء النباتية فمثلاً إذا تم تعديل نبات فول الصويا وإذا كنا نتوقع أن البروتين المطلوب سيتم تعبيره في أوراق النبات فقط، فإن ذلك يعد غير مجدٍ من الناحية الاقتصادية لأن هذا النبات يتصف بقلة كتلته الورقية.
- يُفضل أن يكون النبات غير غذائي لحل مشكلة التلوث الجيني للمحاصيل الغذائية.

30

- يُفضل أن يكون النبات ذاتي التلقيح مثل نبات البندورة، حيث يمكن في هذه الحال زراعته في بيوتٍ زجاجيةٍ معزولةٍ لحل مشكلة التلوث المتصالب.
- في حال تم اختيار نبات ورقي يجب الانتباه لمشكلة الحلمهة الإنزيمة، فقد يحدث تأذٍ للأوراق في أثناء الحصاد مما يؤدي إلى تحرر إنزيمات الحلمهة الموجودة في الخلايا، وهذا قد يسبب حلمهة البروتين المطلوب قبل استخلاصه، لحل هذه المشكلة يمكن تجميد الأوراق مباشرة بعد جمعها.
- تعد الحبوب ملائمةً للحفظ الطويل للمواد الفعالة وذلك بسبب طبيعتها القاسية والجافة، يمكن للبروتين فيها أن يبقى فعالاً لمدة تصل إلى ثلاث سنواتٍ في شروط التخزين العادية.
- تجنب اختيار النباتات الحاوية على مواد فعالةٍ (قلويدات مثلاً) أو سامةٍ .
- تعد الثمار والخضار ملائمةً لإنتاج اللقاحات الفموية وذلك لإمكانية تناولها بشكلها الغض من دون طهي.
- تعد البذور ملائمةً لتعبير البروتينات السامة للنبات، لأنها لا تعد جزءاً من الجهاز الإعاشي للنبات ولا تسبب بالنتيجة تسمماً للنبات ذاته.

ويبين الجدول 1-2 أهم النباتات المستخدمة لتعبير البروتينات الطبية مع ميزات ومساوئ كل منها.

النبات	ميزاته	مساوئه
أوراق التبغ	• كتلة خضراء كبيرة • غير غذائي • سهولة تقبله للدنا • ذاتي التلقيح	• يحوي قلويدات سامة (نيكوتين) • حلمهة أنزيمية للبروتينات • يحوي مواد مؤكسدة تضر بالبروتين المعبر
البرسيم	• من البقوليات، يوفر تكلفة السماد	• غيري التلقيح • حلمهة أنزيمية للبروتينات • يحوي مواد مؤكسدة تضر بالبروتين المعبر
أوراق نبات الصويا	• من البقوليات • ذاتي التلقيح	• مردود الأوراق قليل
أوراق السبانخ	• كتلة خضراء كبيرة	• حلمهة أنزيمية للبروتينات • نبات غذائي
حبوب الرز	• يصلح للبروتينات السامة • مردود عالي من الكتلة الحية • تعتبر بروموتوراته من أقواها في النبات	• نبات غذائي • قد تنتش الحبوب عند التخزين السيء
حبوب الذرة	• يصلح للبروتينات السامة • سهولة تقبله للدنا • مردود عالي من حبوب الذرة	• نبات غذائي • غيري التلقيح
درنات البطاطا	• مناسب للقاحات و الأضداد • مردود عالي من الدرنات	• نبات غذائي • التخزين الطويل يؤدي لتشكل براعم و قلويدات سامة
ثمار البندورة	• مردود عالي من الثمار • إمكانية زراعته في بيوت زجاجية	• نبات غذائي • حلمهة أنزيمية للبروتينات

32

الباب الثالث

إنتاج الكائنات المعدلة وراثياً

Producing of Genetically Modified Organisms

❖ **الفصل الأول**

أسباب التعديل الوراثي للكائنات الحية

❖ **الفصل الثاني**

المبادئ العامة لإنتاج الكائنات المعدلة وراثياً

33

مقدمة

الكائنات المعدلة وراثياً Genetically Modified Organism (GMO):

هي كائنات أجري عليها تعديلٌ وراثيٌ باستعمال تقنيات التنسيل والتأشيب، وقد يقتصر التعديل على نكليوتيدٍ واحدٍ أو قد يشمل مورثات كاملة.

في حالات أخرى يمكن أن تنقل مورثة أو أكثر من كائن حيٍ إلى كائنٍ آخر، ويشار إلى المورثات التي يتم نقلها transgenes وتسمى الكائنات الناتجةtransgenic organisms.

حتى تعمل المورثات المنقولة في الكائن المضيف يجب أن يتم وضعها تحت إشراف مُحرّض Promotor يشرف على تعبير تلك المورثات وينظم ما يلي:

1- مستوى التعبير الجيني للمورثات (عالي أم منخفض).

2- زمن التعبير الجيني: المورثة موجودة باستمرار في الخلية لكن قد لا يتم التعبير عنها إلا في مرحلة معينة من عمر الخلية أو كاستجابة لظرف معين، يتحكم المحرض بذلك.

3- مكان التعبير الجيني: تحوي كل خلايا جسم الكائن الحي المحتوى الوراثي نفسه (مجين genome) ومع ذلك يقوم كل نوع من الخلايا بالتعبير عن مجموعة محددة من المورثات تتوافق مع بنيتها ووظيفتها، فمورثة الغلوبين مثلاً تعبر عن نفسها في الخطوط الخلوية المولدة للكريات الحمر وتبقى هذه المورثة غير مفعلة في باقي نسج الجسم، ويتحكم بذلك أيضاً المُحَرِّض.

لكي نقول بأن الكائن معدلٌ وراثياً يجب أن تحوي كل خلاياه المورثة الجديدة مدمجة مع دنا الكائن، ويجب أن تكون ثابتةً وقابلةً لأن تتضاعف مع كل انقسام خلويٍ.

فعلى سبيل المثال إذا أدخلنا مورثة تعطي اللون الداكن إلى البيضة الملقحة لفئران ذات لون أبيض (صافية الوراثة)، فإذا اندمجت المورثة مع مجين البيضة الملقحة فإنها سوف تتضاعف معه في كل انقسامٍ خلويٍ، وسنجدها في كل خلايا الجنين، وسوف تتطور البيضة الملقحة المعدلة وراثياً لتعطي فأراً داكن اللون، وعندما يتزاوج هذا الفأر الداكن مع فئرانٍ أخرى فإنه سينقل المورثة التي تعطي اللون الداكن إلى الأجيال التالية، وسنشاهد فئراناً داكنةً في النسل، عندها فقط يمكننا القول إن المورثة ثابتةٌ ووظيفيةٌ.

ما هي الكائنات التي يمكن تعديلها وراثياً :

أمكن إجراء تعديل وراثي لعدد كبير من الكائنات يبينها الجدول الآتي:

الجدول 3-1: الكائنات الحية التي أمكن تعديلها وراثياً.

الثدييات	فئران ، جرذان، أرانب، هامستر، أبقار، أغنام، ماعز ...
البرمائيات	ضفادع
الزواحف	سلاحف
الأسماك	سلمون، ترويت، سمك القط

34

لافقاريات	حشرات (ذبابة الفاكهة، البعوض، البق) ديدان.
نباتات	السرو، التبغ، المحاصيل، نباتات الزينة، نباتات طبية.
الكائنات الدقيقة	جراثيم، فطريات، أوالي...

الفصل الأول

أسباب التعديل الوراثي للكائنات الحية

تتعدد أسباب إنتاج الكائنات المعدلة وراثياً فقد يكون ذلك للبحث العلمي الصرف أو قد يكون هناك تطبيقات معينة نذكر بعضها فيما يلي:

أولاً: تغيير النمط الظاهري من خلال تعبير بروتين جديد:

1- إنتاج نباتات ذرة مقاومة للمبيدات العشبية :

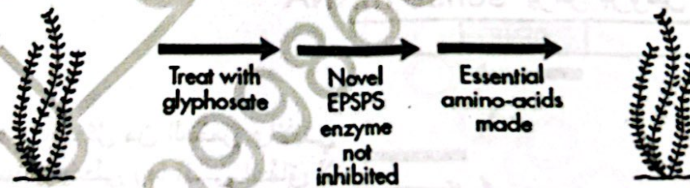
نبات الذرة من نباتات المحاصيل الغذائية الهامة ويؤدي نمو الأعشاب الضارة في الحقول المزروعة بالذرة إلى تراجع كبير في الإنتاجية، لذلك يلجأ المزارعون إلى استعمال المبيدات العشبية كالـ glyphosate لكن هذا المبيد يفتقر إلى الاصطفائية حيث يمكن أن يؤثر أيضاً على نبات الذرة ويؤدي إلى خسارة في المحصول.

Glyphosphate resistance

(a) Wild type plant



(b) Transgenic plant expressing altered EPSPS enzyme



الشكل 3-1: إنتاج نباتات معدلة وراثياً قادرة على مقاومة المبيد العشبي glyphosate

لذلك عمد العلماء إلى إنتاج نباتات ذرة معدلةً وراثياً قادرة على مقاومة الـglyphosate (الشكل 3-1) من خلال تعديل بنية البروتين الذي يستهدفه هذا المبيد العشبي وجعله مقاوماً للمبيد، وهو في هذه الحالة إنزيم EPSPS الذي يتوسط اصطناع الحموض الأمينية العطرية (تم شرح مبدأ هذا التعديل الوراثي في الباب الثاني بالتفصيل).

2- إنتاج حيوانات تستعمل بوصفها نماذج مرضية لدراسة تأثير الأدوية.

اشتقت تسمية الفئران الورمية oncomice من المورثات الورمية oncogenes، وهي مورثات موجودة عند الأحياء جميعها، ووظيفتها تحفيز عمليات انقسام وتكاثر الخلايا بصورة طبيعية، وتسمى المورثات في هذه الحال proto-oncogenes، عند حدوث خللٍ في إحدى هذه المورثات، تخرج عملية الانقسام عن السيطرة، وتصبح الدارة الخلوية غير مضبوطة، مما يؤدي إلى نشوء ورمٍ قد يكون خبيثاً malignant، وتسمى المورثة الطافرة في هذه الحال بمورثةٍ ورميةٍ oncogene.

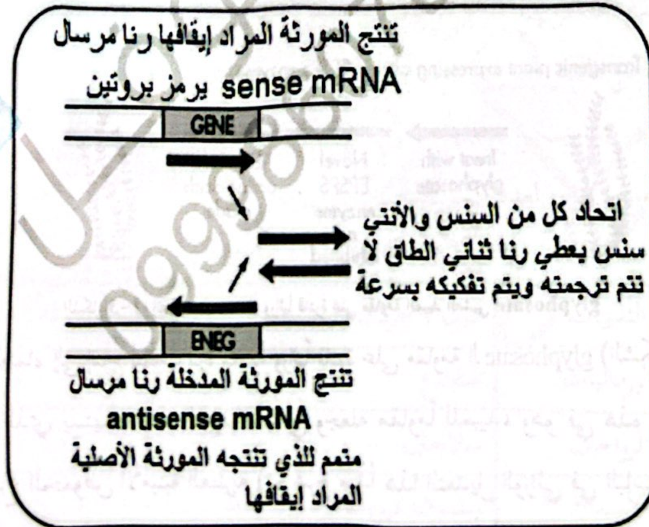
لإنتاج فئران تصلح أن تكون أنموذجاً لورمٍ معين disease model - وليكن سرطان الثدي- لاختبار علاجات جديدة مضادة لهذا السرطان نقوم أولاً بنسخ وتضخيم المورثات المتوقع أن تكون مسؤولة عن هذا الورم (عادة يتم ذلك على عينات من خزع biopsy الورم المستهدف) تحمل بعد ذلك هذه المورثات على ناقل مناسب ثم يتم إدخالها إلى بيضة ملقحة فأرية (باستعمال تقنيات سيرد ذكرها لاحقاً في الفصل الثاني) حيث تتطور البيضة الملقحة إلى فأر حامل للمورثات الورمية يصلح أن يكون أنموذجاً مرضياً لسرطان الثدي.

ثانياً: استعمال الكائنات المعدلة وراثياً كمفاعلات حيوية لإنتاج بعض المركبات:

يمكن استعمال الكائنات الدقيقة أو النباتات المعدلة وراثياً لإنتاج مستقلبات ثانوية أو بروتيناتٍ مأشوبةٍ من مثل اللقاحات والأجسام المضادة وما إلى ذلك (انظر البابين الأول و الثاني).

ثالثاً: إيقاف التعبير الجيني لبعض المورثات Turning genes off :

تستعمل هذه التقنية لوقف التعبير الجيني لمورثاتٍ تؤدي إلى ظهور صفاتٍ غير مرغوبةٍ أو مرضيةٍ. ويتم ذلك من خلال إدخال مورثة -حضرت صنعياً- بحيث تكون ذات تسلسل معكوسٍ ومتممٍ reverse complementary لتسلسل المورثة الأصلية endogenous gene المراد إيقافها (الشكل 3-2)، وينتج عن انتساخ هذه المورثة الدخيلة رنا مرسال (يسمى عادةً antisense mRNA) مكملٌ في تسلسله للرنا المرسال الناتجة عن المورثة الأصلية sense mRNA، تتحد النسختان معاً مما يؤدي إلى تشكل رنا مضاعف الطاق، لا تتم ترجمته في الخلية، وسرعان ما يتم تخريبه بفعل إنزيمات ريبونكلياز خاصة في الخلية.

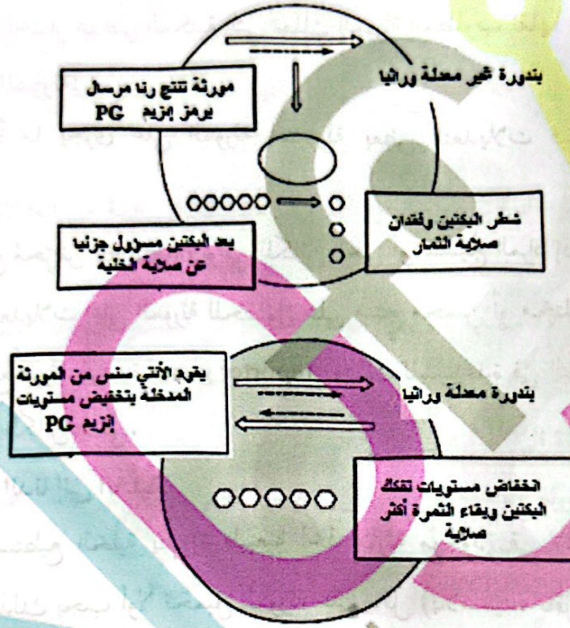


الشكل 3-2: إيقاف التعبير الجيني للمورثات باستعمال تقنية antisense mRNA.

مثال: إنتاج ثمار بندورة صلبة مع المحافظة على اللون الأحمر:

تحوي ثمار البندورة مادة البكتين، وهي عبارةٌ عن عديد سكاريد ومع مرور الوقت يتشكل في ثمار البندورة إنزيم بولي غالاكتوروناز PG، الذي يقوم بتفكيك البكتين مؤدياً إلى تلين ثمار البندورة.

لوقف عملية تلين ثمار البندورة والمحافظة على صلابتها، تم تعديل نبات البندورة بإدخال مورثةٍ متممةٍ ومعاكسةٍ لمورثة البولي غالاكتوروناز، مما يؤدي إلى تشكل antisense mRNA يقوم بوقف ترجمة الرنا المرسال المرمز لإنزيم البولي غالاكتوروناز، فيبقى البكتين بحالٍ سليمةٍ وتبقى ثمار الثمار صلبةً من دون أن تتأثر الصفات الأخرى كتطور اللون الأحمر والطعم والرائحة المميزين لأنها مرمزةٌ على مورثاتٍ مستقلةٍ.



الشكل 3-3: إنتاج ثمار بندورة صلبة بتثبيط مورثة البولي غالاكتوروناز باستعمال تقنية antisense mRNA.

37

الفصل الثاني

المبادئ العامة لإنتاج الكائنات المعدلة وراثياً

توجد بروتوكولات كثيرة لإجراء تعديلات وراثية على كائنات حية، وتختلف هذه البروتوكولات تبعاً لنوع الكائن المراد تعديله، لكنها تشترك جميعاً بمجموعة من المبادئ العامة يمكن إيجازها فيما يلي:

1- عزل المورثة أو المورثات المراد إدخالها:

يتم تحقيق ذلك باستعمال تقنية الـ PCR أو من خلال إنشاء مكتبةٍ جينوميةٍ للكائن الحي المعطي للمورثة، ثم اختيار عناصر المكتبة التي تملك المورثة المطلوب نقلها لكائنٍ آخر.

2- تعديل المورثة:

غالباً ما يجرى على المورثة المعزولة بعض التعديلات قبل إدخالها إلى الكائن الحي، من هذه التعديلات:

- ربطها مع مُحرّض promoter نوعي للكائن الحي أو للنسيج المراد إدخال المورثة إليه.
- إدخال تعديلات على المورثة للحصول على منتجٍ محسنٍ أو مختلفٍ جذرياً .
- ربطها مع مورثة مرشدة reporter gene: وذلك للمساعدة في التأكد من كون المورثة المدخلة قد تم تقبلها من قبل الكائن الحي.

3- إدخال الدنا إلى الخلية:

لا تستطيع الخلية بصورة طبيعيةٍ أخذ مورثة موجودةٍ في بيئتها مالم تكن محمولةً على ناقل مناسب vector، ولذلك يجب أولاً تحميل المورثة على ناقل (بلاسميد، ناقل فيروسي، كوسميد، صبغي صنعي) ومن ثم يتم إدخال هذا الناقل إلى الخلية بإحدى تقنيات التحويل الوراثي المعروفة من مثل: الاستحالة transformation أو باستعمال التثقيب الكهربائي electroporation أو الإعداء بالفيروس transfection .

ويمكن استعمال الحقن المجهري microinjection لإدخال المورثة بشكلٍ مباشرٍ إلى داخل الخلية أو النواة من دون الحاجة إلى تحميلها على ناقلٍ.

4- تكاثر الخلايا لتعطي كائناً كاملاً

أياً كانت الطريقة المستعملة لإدخال المورثة إلى خلايا الكائن الحي - والتي تجري غالباً في الزجاج in vitro- فإننا سوف نحصل في النهاية على عددٍ محدودٍ من الخلايا المعدلة وراثياً، وهنا ينبغي إيجاد طريقةٍ ملائمةٍ للحصول على كائنٍ حيٍ كامل انطلاقاً من هذه الخلايا regeneration. ففي حالة النباتات يمكن تحقيق ذلك باستعمال تقنيات زراعة الخلايا النباتية plant cell culture، حيث تزرع في وسطٍ مغذٍ مناسبٍ، ثم

38

تدفع إلى التمايز باستعمال هرموناتٍ نباتيةٍ تؤدي إلى تشكل الجذور والأجزاء الهوائية وصولاً إلى نبات كاملٍ (انظر الباب الثاني).

أما في حال الخلايا الحيوانية فيتم استعمال تقنية الخلايا الجذعية stem cells أو تقنية نقل نواة الخلايا الجسمية somatic cell nuclear transfer (SCNT) (انظر الباب الخامس).

5- التحقق من احتواء جميع خلايا الكائن على المورثة المدخلة

توجد طرقٌ عدةٌ للتحقق من أن الخلايا تحوي فعلاً المورثة المدخلة، وأنها أدمجت في مجين الخلية وفيما يلي بعض تلك الطرق:

أ - استعمال المورثة المرشدة reporter gene: وهي مورثةٌ تحمّل على الناقل ذاته الذي حملت عليه المورثة المراد نقلها إلى الكائن transgene، تتميز المورثة المرشدة بامتلاكها نمطاً ظاهرياً يسهل تمييزه كإعطاء بروتينٍ متألقٍ مثل green fluorescent protein (GFP) أو إنتاج إنزيمٍ يعطي تفاعلاً لونياً مميزاً مثل إنزيم β-galactosidase.

ب- استعمال تفاعل الـ PCR حيث يجري التحري عن وجود المورثة المدخلة في عينةٍ من الخلايا باستعمال بوادئ نوعيةٍ.

ج- استعمال إحدى تقنيات التهجين بوساطة مسابر probes نوعية لأجزاء من تسلسل المورثة المستهدفة كما في تقنية تلطيخ سوذرن southern blotting.

6- التأكد من قدرة الكائن على نقل المورثة إلى ذريته

ويتم ذلك بالتحري عن وجود المورثة المعنية في أعراس الكائن الحي (أبواغ، حبات طلع، نطاف، بويضات) وذلك باستعمال إحدى التقنيات المذكورة آنفاً.

أمثلة عن إنتاج بعض الكائنات المعدلة وراثياً

أولاً- إنتاج الفأرة العملاقة super mouse

قام العالمان (Palmiter & Brinster) في مطلع الثمانينات من القرن العشرين بعزل مورثة هرمون النمو من الجرذان Rat Groth Hormon (RGH) وقاموا بإدخالها إلى الفئران مما أدى إلى زيادة كبيرة في حجم الفأر، يمكن أيضا بطريقة مشابهة إدخال مورثة هرمون النمو البشري إلى الفئران.

مراحل إنتاج الفأرة العملاقة

1- عزل وتعديل مورثة RHG من الجرذان

تم عزل دنا المجين من الجرذان وتمت تنقيته، ثم تم تضخيم مورثة RGH باستعمال تفاعل الـ PCR بوساطة بوادئ نوعيةٍ لهذه المورثة. بعد تضخيم المورثة تم وضعها تحت إشراف مُحَرِّضٍ promotor قويٍ مثل المحرض المشرف على تعبير مورثات metallothionin في الفئران (MT promoter) كما هو مبين في الشكل 3-4.

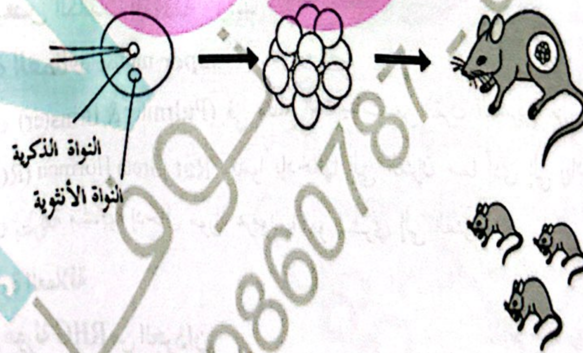
مورثات metallothionin هي مورثات موجودةٌ عند الفئران ويتم التعبير عنها بشكل خاصٍ في الكبد حيث تعطي بروتينات تقوم باستخلاب المعادن الثقيلة وتحمي الفأر من التسمم بها. يتم تفعيل المحرض بوجود أحد المعادن الثقيلة ويبقى مثبطاً في حالة غيابها.



الشكل 3-4: وضع مورثة هرمون النمو الجرذي تحت إشراف MT promotor وإدخالها إلى الفئران.

2- إدخال الدنا إلى خليةٍ فأريةٍ

تم إدخال الناقل الموضح في الشكل 3-4 إلى بويضةٍ فأريةٍ، حيث لاحظ العلماء أن أفضل مرحلةٍ لإدخال الدنا هي بعيد الإلقاح مباشرةً وقبل اندماج النواة الذكرية بالنواة الأنثوية (الشكل 3-5)، حيث تم حقن الناقل الحامل لمورثة RGH في النواة الذكرية تحت المجهر microinjection باستعمال جهاز تعديل مجهري micromanipulator. بعد دخول المورثة إلى البيضة الملقحة تندمج بشكلٍ غير موجهٍ في أحد صبغياتها، إذ أن موقع المورثة غير مهمٍ لأداء وظيفتها طالما أنها موضوعةٌ مباشرةً تحت إشراف محرضٍ خاصٍ بها.



الشكل 3-5: التعديل الوراثي لبيضة ملقحة فأرية باستعمال الحقن المجهري وتطورها إلى فأر كامل.

3- تطور البيضة الملقحة إلى فأرٍ كاملٍ

زرعت البيضة الملقحة المعدلة وراثياً في رحم أنثى فأرٍ حاملةً حملاً كاذباً peseudo pregnant، وهي أنثى تمت مزاوجتها بذكرٍ عقيمٍ (تزاوج طبيعي)، حيث يؤدي ذلك إلى تغير الحالة الفيزيولوجية للفأرة وتصبح على استعدادٍ للحمل.

زرعت البيضة الملقحة في القناة الناقلة للبيوض حيث تقوم بانقساماتٍ عدةٍ قبل أن تصل إلى الرحم وتعشش فيه وتتطور إلى جنينٍ ثم فأرٍ كاملٍ.

لا تتجاوز نسبة ولادة فأرٍ معدلٍ وراثياً في أحسن الحالات ال 10%، إذ يمكن أن تتأذى البيضة الملقحة بفعل الحقن المجهري أو تفشل في التعشيش في الرحم أو يتم إجهاض الجنين في إحدى المراحل.

4- التأكد من احتواء المولود على المورثة المنقولة transgene

يتم ذلك كما ورد سابقاً باستعمال الPCR أو تلطيخ سوذرن southern blotting.

5- التأكد أن المورثة يتم التعبير عنها في المولود.

قبل التأكد من عمل المورثة يجب تفعيل المُحَرِّض المشرف عليها، ويتم ذلك من خلال تقديم طعام للفأر يحوي أملاح الزنك مما يؤدي إلى بدء عمل المورثة وإنتاج هرمون النمو الجرذي (يكفي معدن الزنك ولا داعي لاستعمال معادن أخرى أكثر سميّةً).

ويمكن التحقق من عمل المورثة وإنتاج هرمون RGH بطرقٍ عدةٍ منها:

- الكشف عن وجود هرمون النمو الجرذي RGH في دم الفأر ومعايرته.
- قياس كمية الرنا المرسال mRNA الذي يُنتسخ من المورثة باستعمال بوادئ نوعية موسومة بطريقة تلطيخ نورذرن northern blotting .
- أو بشكل بسيط من خلال ملاحظة تطور النمط الظاهري للمورثة phenotype ، في هذه الحال قياس سرعة نمو الفأر (حجمه ووزنه).

6- مزاوجة مواليد الجيل الأول المعدلة وراثياً

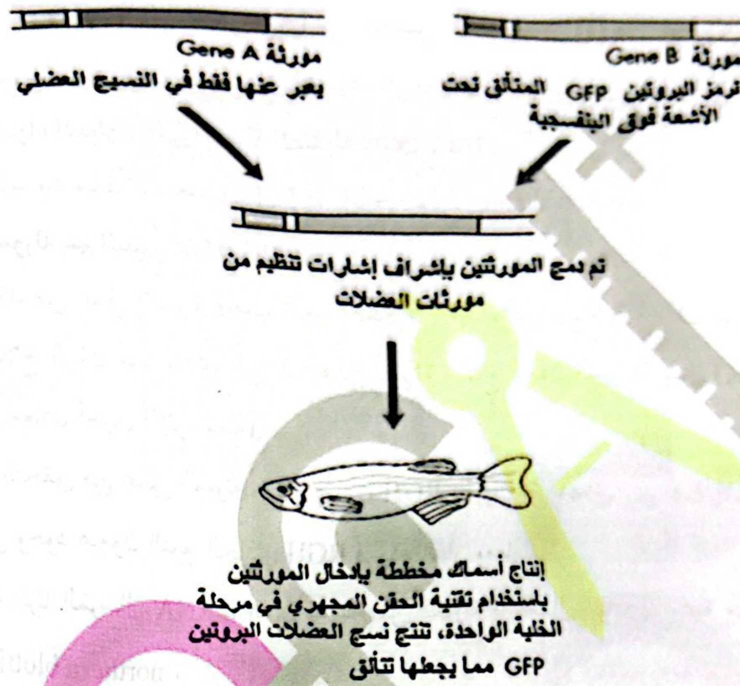
تهدف هذه العملية إلى الحصول على فئرانٍ متماثلة اللواقح تحوي في شفعيها الصبغيين على المورثة المدخلة، لأن عملية دخول المورثة تكون غالباً على أحد الصبغيين، وبمزاوجة المواليد الناتجة (متخالفة اللواقح) نحصل على عدد من المواليد متماثلة اللواقح، يتم انتقاؤها واعتمادها.

ثانياً- إنتاج أسماك مخططة Zebra Fish

كان هدف العلماء من هذا التعديل الوراثي هو محاولة استعمال مورثةٍ مرشدةٍ reporter gene للتأكد من أن مُحَرِّضاً ما يعمل فقط في نسيجٍ محددٍ بشكلٍ انتقائي.

لإنجاز ذلك تم تضخيم مورثة *gfp* التي تنتج بروتيناً مفلوراً هو geen fluoresce protein (GFP). تعد مورثة *gfp* بمنزلة مورثةٍ مرشدةٍ، حيث تم إدخالها إلى ناقلٍ مناسبٍ تحت إشراف مُحَرِّضٍ يعمل عادةً على تنظيم مورثاتٍ مسؤولةٍ عن إنتاج بروتينات العضلات الهيكلية للأسماك (كالأكتين أو الميوزين). أدخلت البنية المأشوبة الناتجة recombinant construct باستعمال تقنية الحقن المجهري إلى بيضة سمكةٍ بُعَيد إلقاحها مباشرةً، وحضنت البيضة فتطورت وأعطت أسماكاً، أبدت عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية UV خطوطاً

خضراء متألقة في عضلاتها الهيكلية كدليلٍ على عمل المحرض و تعبير مورثة *gfp* في عضلات السمكة (الشكل 3-6).



الشكل 3-6: مبدأ إنتاج أسماك مخططة تعبر في عضلاتها البروتين المفلور GFP

ثالثاً- تعطيل مورثة من مجين كائن حي Knockout gene

تهدف هذه التقنية إلى تعطيل المورثة نهائياً من خلال إدخال طفرة أو رامزة تَوَقُّف فيها، وذلك لأهداف مختلفة: فقد يرغب العلماء بدراسة تغيرات النمط الظاهري في حالتي وجود/عدم وجود هذه المورثة، وذلك لتحديد وظيفة المورثة بدقة، أو قد ترمز المورثة صفةً غير مرغوبةٍ (كمرضٍ ما)، فيكون عندها من المفيد تعطيل تلك المورثة، وهذا أحد أساليب المعالجة الجينية للأمراض gene therapy.

يلاحظ عند إدخال دنا غريب إلى نواة خلية يراد تعديلها وراثيا نمطين لاندماج (تأشيب recombination) الدنا المدخل في مجين الخلية المضيفة:

1- التأشيب المتخالف non-homologous recombination: يحدث فيه اندماج عشوائي للدنا المدخل في أحد صبغيات الخلية، ويختلف مكان الاندماج في كل مرة تعاد فيها التجربة، ومن ثم يفتقر هذا النمط إلى التكرارية، لكنه يكون كافياً لإنتاج كائنات معدلةً بحيث تنتج بروتيناً جديداً، أما لتعطيل مورثة بشكل انتقائي فلا يفيد هذا النوع من التأشيب.

2- التأشيب المتماثل homologous recombination: يحدث فيه اندماج للدنا المدخل في موقع محدد locusمن مجين الخلية ويمتاز بالتكرارية، حيث يدخل الدنا في ذات الموقع كلما أعيدت التجربة، ويفيد هذا النمط من التأشيب في تعطيل مورثة محددة من مجين الخلية أي عمل knockout gene.

42

يحدث التأشيب المتماثل عندما تحوي قطعة الدنا المدخلة في طرفيها على تسلسلات مشابهة لتسلسل المجين في الموقع المستهدف. أما التأشيب المتخالف فيحصل بآلية الصدفة ويخضع لقوانين الاحتمالات.

عند استعمال التأشيب المتماثل لإدخال طفرة أو رامزة تَوَقُّف في مورثة محددة من المجين بهدف تعطيلها فإننا نواجه تحدياً يتعلق بإيجاد آلية مناسبة لاصطفاء selection الخلايا تضمن:

- استبعاد الخلايا التي لم تنجح في أخذ الدنا الغريبة.
- استبعاد الخلايا التي تقبلت الدنا ودمجته في مجينها عشوائياً (تأشيب متخالف).

ويجب أيضاً إيجاد طريقة للحصول على كائن كامل انطلاقاً من الخلية/الخلايا التي تم تعطيل المورثة فيها.

مراحل إنتاج كائن حيٍ يحوي مورثة معطلة Knockout gene:

جميع المراحل يوضحها الشكل 3-7.

1- تضخم المورثة المطلوب تعطيلها - ولتكن المورثة *geneX*- باستعمال تقنية الـ PCR.

2- تُدخَل مورثة المقاومة للنيومايسين *neo* ضمن تسلسل المورثة X، تقوم مورثة *neo*بدورٍ مزدوجٍ، فمن جهةٍ يعطل دخولها عمل المورثة X ومن جهة ثانية تلعب دور واصمة انتقائية selective marker تضمن لاحقاً انتقاء الخلايا التي جرى فيها تعطيل المورثة X.

3- تُدخَل المورثة *tk* مباشرة أسفل المسار downstream بالنسبة للمورثة X، مورثة *tk* ترمّز إنزيم thymidine kinase وهو إنزيم موجود أصلاً في فيروس الحلأ البسيط *herpes simplex* يجعل منه حساساً للعلاج بالمضاد الفيروسي gancyclovir. لأن gancyclovir عبارة عن طليعة دوائية تتم فسفرتها بإنزيم thymidine kinase متحولة إلى محاكي نكليوتيدي يثبط انتساخ الرنا الفيروسي ويمنع بالتالي تكاثر الفيروس، فأي خلية تحوي مورثة *tk* ستصبح أيضاً حساسة للـ gancyclovir.

4- يتم إدخال البنية الناتجة *geneX (neo)+tk* إلى خلايا الكائن الحي باستعمال إحدى التقنيات الموضحة سابقاً.

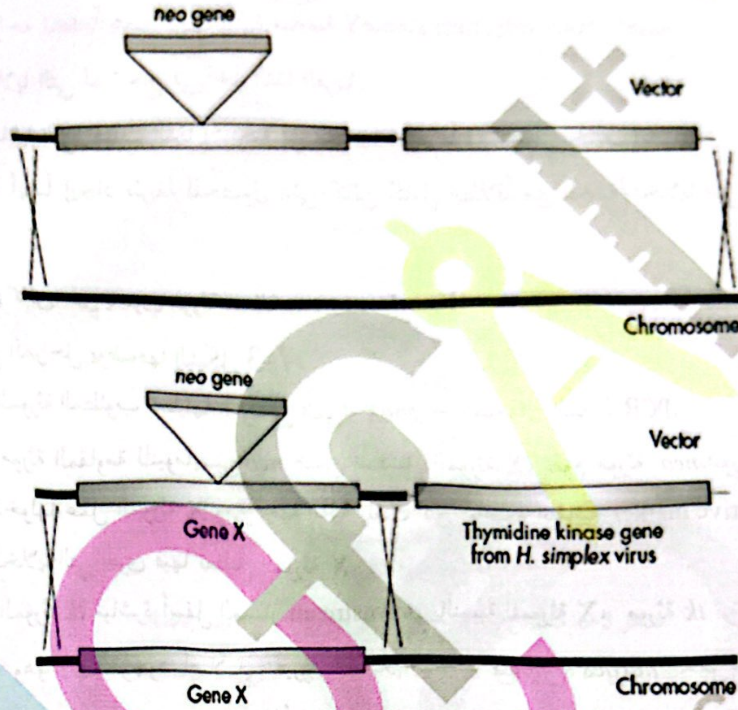
5- تزرع الخلايا الناتجة في وسط زرعي اصطفائي يحوي كلاً من النيومايسين وgancyclovir. فنكون أمام حالات عدةٍ:

أ- تموت الخلايا التي لم تأخذ البنية السابقة لعدم احتوائها على مورثة المقاومة للنيومايسن.

ب- تموت الخلايا التي حدث فيها تأشيب متخالف (الشكل 3-7-أ) نتيجة لدخول كامل البنية *geneX (neo)+tk* إلى أحد صبغيات الخلية بشكل غير موجه، وبالنتيجة الخلية ستكون حساسة للـ gancyclovir.

ج- الخلايا التي حدث فيها تأشيب متماثل (الشكل 3-7-ب) ستكتسب فقط الجزء *geneX (neo)* من البنية الصنعية، لأن أطراف هذا الجزء تحوي تسلسلات مطابقة لنهايات المورثة *geneX* من مجين

الكائن الحي، مما سيؤدي إلى دخول موجه لهذا الجزء فقط، وبالنتيجة ستصبح الخلايا مقاومة للنيومايسين وغير حساسة لل gancyclovir، أي أنها ستنمو على الأطباق الحاوية على النيومايسين و gancyclovir.



الشكل 3-7: طريقة تعطيل مورثة محددة من مجين كائن حي.

6- تنقل نواة إحدى الخلايا النامية على الوسط الزرعي وتزرع في بويضة أنثوية منزوعة النواة للكائن المستهدف، حيث تزرع لاحقاً في رحم أنثى، لتنمو وتتطور إلى كائن حي متخالف اللواقح heterozygote عطلت المورثة *geneX* في أحد شفعيه الصبغيين.

7- بمزاوجة الذكور والإناث متخالفة اللواقح نحصل على مواليد متماثلة اللواقح heterozygote للمورثة المعطلة *geneX* knockout.

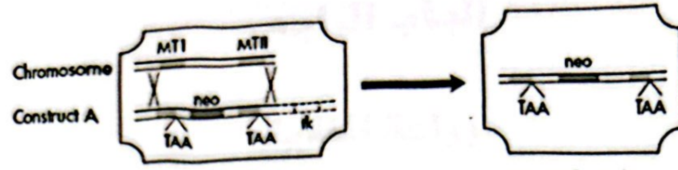
رابعاً- إنتاج فئران حساسة للمعادن الثقيلة

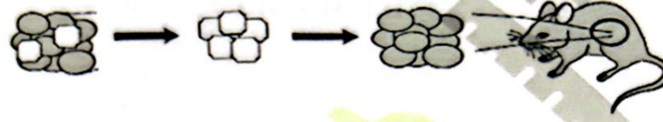
يهدف هذا التعديل الوراثي للحصول على فئرانٍ حساسةٍ للمعادن الثقيلة بتراكيز ضئيلةٍ للغاية، وذلك لاستعمالها كوسيلةٍ لاستشعار التلوث البيئي بالمعادن الثقيلة. المعروف أن الفئران تتحمل حداً معيناً من المعادن الثقيلة في الوسط وذلك لامتلاكها بروتيناتٍ تعرف باسم metallothionine ينتجها الكبد وتقوم باستخلاب المعادن الثقيلة وتحمي الفأر من التسمم بها.

يعتمد التعديل الوراثي على تعطيل المورثات المرمزة لهذه البروتينات من خلال عمل **knockout** فيها.

يبين الشكل 3-8 أن الفئران تمتلك عادة مورثتين لإنتاج metallothionine تسميان *MTII, MTI*، لذا عند إحداث الطفرة يجب إحداثها في كلتي المورثتين ولا يكفي تعطيل مورثة واحدة فقط.

44







الشكل 3-8: مبدأ إنتاج الفئران الحساسة للمعادن الثقيلة من خلال إيقاف عمل مورثتي MTI, II .

مراحل تعطيل مورثتي *MTI, MTII* في الفئران:

1- يتم إدخال مورثة المقاومة للنيومايسين *neo* في المجال الواقع بين مورثتي *MTI* و*MTII*.

2- يتم إدخال رمز توقف (TAA) في كل من *MTI* و*MTII* وذلك لإيقاف ترجمتهما.

3- يتم إدخال مورثة *tk* (الحساسية لل Gancyclovir) أسفل المسار down stream من المورثتين *MTI* و *MTII*.

4- تحمل البنية الناتجة على ناقل مناسب وتُدخل إلى خلايا جذعية جنينية فأرية ESCs.

5- تزرع الخلايا في أوساط زرعية تحوي النيومايسين وgancyclovir فتنمو فقط الخلايا التي حصل فيها تأشيب متماثل للبنية *MTI(TAA)-neo-MTII(TAA)*.

6- تستعمل تقنية نقل نواة الخلية الجسمية SCNT لنقل نواة الخلايا الجذعية الجنينية إلى بويضة فأرية منزوعة النواة.

7- تزرع البيضة الناتجة في رحم أنثى فأرٍ حاملةً حملاً كاذباً فتتطور إلى مولود متخالف اللواقح heterozygous.

8- تزاوج المواليد متخالفة اللواقح للحصول على نسل متماثل اللواقح homozygous حساس لأدنى تركيز من المعادن الثقيلة.

الباب الرابع

زراعة الخلايا

Cell culture

❖ **الفصل الأول**

إنشاء المزارع الخلوية والحفاظ عليها

❖ **الفصل الثاني**

نمو الخلايا و التغيرات التي تطرأ عليها

مقدمة

يقصد عادة عند الحديث عن زراعة الخلايا cell culture خلايا حقيقيات النوى وليس مزارع خلايا الكائنات الدقيقة من جراثيم أو فطور أو خمائر.

وقد تطورت زراعة الخلايا تدريجياً حتى وصلت إلى ما هي عليه الآن، ففي بدايات القرن التاسع عشر قام العالم الإنكليزي Sydney ringer بتركيب محلول معادل للتوتر isotonic مكون من مزيج لأملاح عدة: كلوريد الصوديوم، كلوريد البوتاسيوم، كلوريد المغنزيوم، كلوريد الكاليسيوم واستعمله لحفظ القلب المعزول وعرف هذا المحلول بمحلول رينغر.

بعد ذلك قام العالم Wilhelm roux بعزل الوريقة الوسطى من جنين الدجاج وحفظها في محلول ملحي معادل للتوتر salin solution ودافئ لأيام عدة.

ولاحقاً تمكن علماء الفيروسات Weller وChapman وAndrous من عمل مزرعة من خلايا كلية القرد واستعملوها لإكثار الفيروسات ليفتحوا بذلك الباب أمام استنبات الخلايا الحيوانية والبشرية بشكلها المعروف حالياً.

وقبل البدء بالحديث عن تقنية زراعة الخلايا لابد من تعريف عدد من المصطلحات المهمة:

المزرعة الخلوية: هي مستنبت خلوي مكون من خلايا مبعثرة مأخوذة من نسيج محدد أو من مزرعة أولية أو من خط خلوي أو من سلالة خلوية، حيث تم تفريق الخلايا المأخوذة بطريقة فيزيائية أو معالجة كيميائية أو إنزيمية ثم تم بعد ذلك زرعها في وسط مناسب، حيث يفترض بها أن تنمو وتتطور بشكل مشابه لما هو عليه في النسيج الأصلي.

المزرعة الأولية primary culture: وهي أول مزرعة نحصل عليها بعد زرع أخيذة من نسيج محدد في وسط زرعي مناسب.

الخط الخلوي cell line: هو مجموعة من الخلايا المأخوذة أصلاً من نسيج واحد ولكنها مختلفة نوعاً ما عن بعضها بعضاً، تمت زراعتها في وسط محدد وأخضعت لعدد من عمليات التمرير passaging، فتجانست نوعاً ما وتشكلت لها صفات معينة خاصة بها ومختلفة جزئياً عن النسيج الأصلي المأخوذة منه.

تمرير الخلايا cell passaging: هي عملية نقل الخلايا من وسط إلى آخر.

السلالة الخلوية cell strain: مجموعة من الخلايا المتماثلة تماماً لكونها اشتقت بالأصل من خلية واحدة باستعمال تقنيات الاستنساخ cloning أو تم عزلها بتقنية تضمن تطابق الخلايا مثل تقنية الجريان الخلوي flow cytometry.

أهمية زراعة الخلايا

تمتلك تقنية زراعة الخلايا أهمية كبيرة لأنها تتداخل مع علوم حيوية عدة ومن ضمنها:

1- علم تأثير الأدوية:

حيث يمكن استعمال مزارع الخلايا لدراسة تأثير الأدوية المكتشفة حديثاً أو سميتها على الخلايا أو حتى دراسة بعض خواصها الحركية.

2- علم الكيمياء الدوائية:

يهتم هذا العلم بتطوير مشتقات جديدة انطلاقاً من مركبات دوائية معروفة من خلال التعديل على بنية هذه المركبات، مما ينجم عنه مئات المشتقات الجديدة والتي لابد من اختبارها لمعرفة فعاليتها وسميتها وخواصها، وتقدم تقنية زراعة الخلايا بيئة مثالية لاختبار هذه المشتقات.

3- علم البيولوجيا الجزيئية:

يمكن باستعمال تقنيات البيولوجيا الجزيئية إنتاج خطوط خلوية معدلة وراثياً لاستعمالها في دراسة حالات مرضية محدد أو لدراسة تأثير الأدوية على المستوى الجزيئي وعلى الجملة الوراثية للخلية (السمية الجينية gene toxicity).

وقد زاد في الآونة الأخيرة استعمال المزارع الخلوية على نطاق واسع في العالم وذلك للأسباب الآتية:

1- سهولة عمل المزارع الخلوية واستعمالها في التجارب مقارنة مع استعمال حيوانات التجربة (عقبات أخلاقية وقانونية وتقنية).

2- إمكانية زرع خلايا طبيعية أو سرطانية أو حتى إنتاج خلايا معدلة وراثياً.

3- القدرة على التحكم بالمتغيرات المحيطة بالخلايا (من مثل درجة الحرارة ودرجة الحموضة ونسبة الغازات والشوارد) وذلك من خلال تركيبة الوسط الزرعي الأمر الذي لا يمكن تحقيقه في حيوانات التجربة.

الفصل الأول

إنشاء المزارع الخلوية والحفاظ عليها

أولاً: إنشاء المزارع الخلوية:

يتضمن إنشاء مزرعة خلوية جديدة أربع خطوات أساسية هي: تأمين مصدر مناسب للخلايا، ثم اقتطاع عينه من هذا المصدر والعمل على تحويل الخلايا إلى الحال المعلقة، ثم وضع الخلايا في وسط زرعي مناسب يؤمن متطلبات النمو لهذه الخلايا، وأخيراً حضن الخلايا في شروط مناسبة تضمن لها الحياة والتكاثر.

1- مصادر الخلايا:

يمكن الحصول على الخلايا للزراعة من نسج جنينية أو جسمية وتفضل عادة الخلايا الجنينية لأنها تتكاثر بشكل أسرع، كما أنها أقدر على تحمل الصدمة التي تعاني منها الخلايا عند نقلها من الكائن الحي إلى الوسط الزرعي.

ومن الأجنة المستعملة بشكل شائع للحصول على الخلايا نذكر جنين الدجاج وجنين الفأر، و يتميز جنين الدجاج أنه أكبر حجماً من جنين الفأر عندما يكونان في المرحلة التطورية ذاتها، مما يؤمن عدداً أكبر

من الخلايا يكفي لعمل التجارب المطلوبة. ويستعمل جنين الدجاج بشكل مفضل للحصول على الخلايا المشتقة من الوريقة الوسطى من مثل خلايا الكبد وخلايا الرئة.

أما جنين الفأر فهو مثالي للحصول على خلايا الأرومات الليفية fibroblasts والتي تستعمل كطبقة خلوية مغذية feeder layer عند زرع الخلايا الجذعية (انظر الباب الخامس).

وتكون مدة الحمل عند أنثى الفأر قصيرة حيث تبلغ حوالي 21 يوماً ويمكن اعتباراً من اليوم الثالث عشر البدء بأخذ عينات الخلايا من الجنين حيث تكون النسج قد تمايزت عن بعضها بعضاً ويمكن عندها أخذ الخلايا من النسيج المطلوب.

إضافة إلى الخلايا الجنينية يمكن أخذ العينات من خلايا جسمية نذكر منها:

- كريات الدم البيضاء المأخوذة من عينة دم وريدي.
- خلايا النسج الطرية من مثل الرئتين والكبد والكلى.
- عينات الخزع الورمية وتشكل مصدراً مهماً للحصول على مزارع الخلايا السرطانية.

يمكن أخذ قطعة من هذه النسج وتنميتها بطريقة بسيطة من خلال وضعها في طبق يحوي وسط زرعي، تغادر الخلايا القطعة وتستعمر كامل مساحة الطبق وتعرف هذه الطريقة البدائية بالزراعة النسيجية الخارجية explant culture.

ويفضل بعثرة الخلايا أولاً وتحويلها إلى الحالة المعلقة قبل زرعها وذلك بطريقة ميكانيكية أو بمعالجة إنزيمية.

2- تفريق الخلايا لعمل مزرعة خلوية

أ- زرع الخلايا من دون تفريقها

يمكن زرع عينة الخلايا دون تفريقها بطريقة explant culture (الشكل 4-1) حيث توضع قطعة النسيج المأخوذة في طبق ويصب عليها كمية من الوسط الزرعي السائل، وتحضن في شروط مناسبة، تبدأ بعض الخلايا بمغادرة قطعة النسيج إلى الوسط لتنمو وتتكاثر فيه وتستعمره.



الشكل 4-1: زراعة الخلايا بطريقة الزراعة النسيجية الخارجية explant culture.

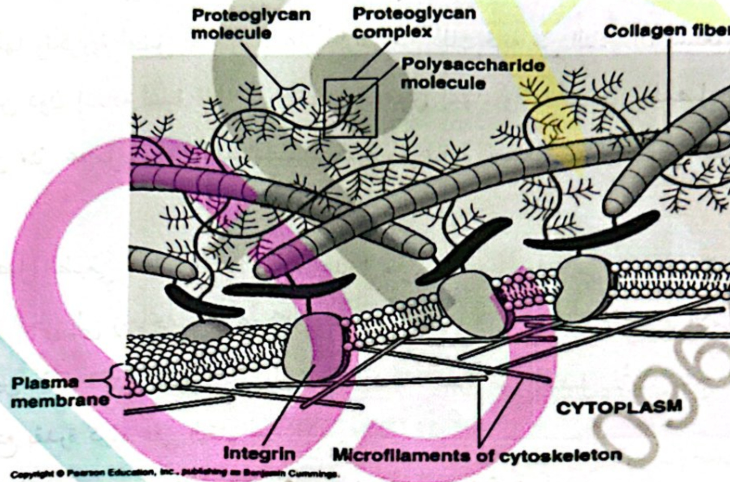
تصلح هذه الطريقة فقط للخلايا القادرة على الغزو والانتشار invasion في حين تموت باقي الخلايا التي لا تستطيع مغادرة القطعة النسيجية، وبالنتيجة تمثل المزرعة الخلوية النامية جزءاً فقط من العينة النسيجية الأصلية.

من الخلايا القادرة على الغزو والانتشار نذكر الخلايا السرطانية والخلايا الجنينية والخلايا الجذعية.

ب- تفريق الخلايا بالطريقة الإنزيمية

يجمع بين خلايا النسيج عادة المادة البينية (المطرس) extra cellular matrix (ECM) وهي مكونة من ألياف الكولاجين والإيلاستين (بروتينات) إضافة إلى عديدات سكاريد، ويؤمن المطرس الدعم البنيوي للنسيج (الشكل 4-2).

لتحويل الخلايا إلى الشكل المبعثر لابد من تحطيم المطرس ويمكن تحقيق ذلك من خلال معالجة العينة بإنزيمات البروتياز التي تفكك ألياف الكولاجين والإيلاستين.



الشكل 4-2: بنية المادة خارج الخلوية.

من إنزيمات البروتياز المستعملة لتفريق الخلايا نذكر:

1- إنزيمات التربسين وتسمى عندها العملية بـ trypsinization ويمكن استعمال التربسين الخام المعزول من أمعاء الحيوانات كالأبقار أو الخنازير، كما ويمكن استعمال التربسين النقي المحضر بطرق التأشيب، ويعطي التربسين النقي تكرارية أعلى من التربسين الخام، في حين تكون القوة التفريقية للتربسين الخام أكبر نظراً لاحتوائه على آثار من إنزيمات هاضمة أخرى.

2- إنزيمات الكولاجيناز وهي نوعية لتفكيك ألياف الكولاجين.

وقد تحتاج الطريقة الإنزيمية إلى رفع درجة الحرارة والحضن لمدة معينة، إلا أن إطالة مدة الحضن قد تؤدي إلى تخريب وتفكك الخلايا ذاتها بفعل الإنزيمات الهاضمة، لذا يجب مراقبة العينة مجهرياً وإيقاف التهضيم قبل أن تبدأ الخلايا بالتخرب.

ج- تفريق الخلايا بالطرائق الميكانيكية

يتم تجزئة القطعة النسيجية بشكل ميكانيكي بحت، حيث تقطع أولاً إلى أجزاء صغيرة ثم تمرر من خلال سلسلة من المناخل المعدنية تضيق فتحاتها تدريجياً.

وتعد هذه الطريقة مناسبة للنسج الرخوة من مثل النسج العصبية، كما أن الخلايا المزروعة تكون ممثلة وبشكل جيد للنسيج المأخوذة منه.

3- اختيار الوسط الزرعي الملائم

كان المصل الدموي يستعمل في البداية كوسط لزراعة الخلايا كون الخلايا في الجسم تستمد المواد المغذية من المصل بصورة طبيعية، وكان المصل يعزل من دماء حيوانات التربية (أحصنه، أبقار، ... وغيرها) لكن العلماء واجهوا مشكلة أساسية هي اختلاف تركيبة المصل من وجبة إلى أخرى تبعاً لظروف تربية الحيوانات ونوعها مما أدى إلى ضعف في تكرارية التجارب التي أجريت على الخلايا المنماة على المصل الدموي.

طور العلماء أوساطاً زرعية محددة التركيب defined media محضرة صنعياً مما يضمن تطابق التركيب في الوجبات كلها وتكرارية أفضل للتجارب، على الرغم من ذلك فإنه من النادر أن تستعمل الأوساط الصنعية بشكل صرف من دون إضافة نسبة قليلة من المصل الدموي إليها، وذلك لاحتواء المصل على عناصر ضرورية لنمو الخلايا من مثل عوامل النمو، ومضادات التريبسين، وعوامل تساعد الخلايا على التثبت والالتصاق على الأسطح.

يؤمن المصل الطبيعي إنعاشاً للخلايا ويساعدها على التأقلم وتجاوز مرحلة الصدمة الناتجة عن الانتقال من جسم الكائن الحي إلى زجاجات الزرع، وكلما كانت الخلايا أكثر حساسية تطلب الأمر زيادة نسبة المصل الطبيعي، في حين لا تحتاج الخلايا السرطانية إلى كمية كبيرة من المصل لأنها تنتج عوامل النمو اللازمة بنفسها، كما تتمتع بقدرة كبيرة على البقاء حية.

إضافة إلى المصل الطبيعي يحوي الوسط الزرعي على المضافات الآتية:

- وقاء مناسب للحفاظ على درجة pH مشابهة للوسط الحي أي 7,4، تضاف عادة، أملاح البيكربونات والتي تشكل مع غاز CO_2 الموجود في جو الحاضنة وقاءً مناسباً.
- مشعر مناسب (أحمر الفينول مثلاً) يفيد في الاستدلال على تغيرات pH الوسط مع الزمن.

عندما تنمو الخلايا تقوم بطرح نواتج استقلابها في الوسط والتي تخفض pH الوسط وتجعله غير مناسباً للنمو.

في بداية الزرع يكون الوسط ذا لون وردي خفيف ومع الزمن وزيادة نسبة الحمض يتحول اللون إلى الشاحب أو الأصفر مما يدل على انخفاض pH المزرعة وضرورة تغيير الوسط الزرعي (عملية feeding).

4- شروط و متطلبات الحضن

تحتاج الخلايا بعد زرعها في الوسط إلى تأمين مجموعة من الشروط نذكر منها:

- تأمين درجة الحرارة مثالية لعمليات النمو والتكاثر وهي درجة حرارة جسم الكائن الحي الذي أخذت منه الخلايا (في حالة الخلايا البشرية 37°م).

- يتم توصيل الحاضنة الخلوية إلى أسطوانات لغاز CO_2 بحيث تؤمن باستمرار في الحاضنة جواً يحوي غاز CO_2 بنسبة 5%، حيث ينحل غاز CO_2 في وسط الزرع معطياً حمض الكربون الذي يشكل مع البيكربونات الموجودة في الوسط وقاءً مناسباً يضمن pH بحدود 7,4 الضرورية لنمو الخلايا.

- لا تحتاج الخلايا إلى ضخ غاز الأكسجين في الحاضنة لأن أكسجين الهواء يكفيها، بل على العكس من ذلك يكون من الضروري حماية الخلايا من زيادة الأكسجين القادر على توليد جذور حرة، قد تلحق الضرر بالخلايا، ولتحقيق ذلك وحماية الخلايا من الفعالية المؤكسدة يضاف إلى الوسط مادة الغلوتاتيون المرجعة.



الشكل 4-3: مختبر زرع الخلايا ومحتوياته.

ثانياً- عمليات الخدمة التي تجرى على المزارع الخلوية

عند توافر الشروط المناسبة للخلايا فإنها سوف تنمو وتتكاثر حتى تغطي كامل مساحة السطح الذي توفره لها زجاجة الزرع.

ملاحظة: ترسو الخلايا السوية على سطح قعر زجاجة الزرع وتنمو عليه لتشكل طبقة مستمرة ووحيدة من الخلايا monolayer، خلافاً لخلايا الجراثيم التي تشكل معلقاً في وسط الزرع.

مع استمرار نمو الخلايا وتكاثرها يحدث الآتي:

- تستنزف المواد المغذية تدريجياً وتتراكم النواتج الاستقلابية.
- يحدث تماس بين الخلايا المتجاورة على سطح قعر الزجاجة مما قد يحرض توقف الدارة الخلوية cell cycle arrest ، ويؤدي إلى توقف انقسام الخلايا ويحدث ذلك عندما تشغل الخلايا كامل سطح القعر ولا يتبقى مكاناً فارغاً.
- قد يحرض التماس الخلوي تمايزاً خلوياً غير مرغوب فيه.
- قد يحدث تنخر لبعض الخلايا necrosis أو استموات apoptosis.

نتيجة لما سبق يجب إجراء بعض عمليات الخدمة التي تضمن استمرارية المزرعة الخلوية، وتشمل هذه العمليات تغير الوسط وتمرير الخلايا.

1. تغيير الوسط الزرعي

وتعرف هذه العملية أيضاً بال feeding، وتجرى عند تردي نوعية الوسط الزرعي نتيجة لنمو الخلايا وقيامها باستهلاك المكونات الغذائية وطرح نواتجها الاستقلابية، ويستدل على ذلك من تغير لون الوسط إذ يصبح شاحباً أو مصفراً بدلاً من لونه الوردي.

تعتمد طريقة تبديل الوسط على نوع المزرعة الخلوية:

أ- في حالة المزارع المعلقة (الخلايا التي تنمو معلقة في وسط الزرع) نقوم أولاً بتثفيل المزرعة ورمي الوسط القديم ثم إعادة بعثرة الخلايا في كمية مناسبة من الوسط الجديد.

ب- في حالة الخلايا التي تنمو ملتصقة على سطح قعر زجاجة الزرع adherent cells نقوم بسحب الوسط الزرعي بهدوء بالماصة، ثم نضيف كمية مناسبة من الوسط الزرعي الجديد.

ويجب الانتباه إلى عدم إضافة كمية مبالغ بها من الوسط الزرعي الجديد لأن ذلك سيؤدي إلى تمديد شديد لعوامل النمو والإنزيمات التي تنتجها الخلايا مما سيفقدها فعاليتها وسيؤخر نمو الخلايا وانقسامها.

تكون عملية تغيير الوسط الزرعي مجدية عندما تكون الخلايا ما تزال فتية ولم تبلغ بعد طور الشيخوخة (طور توقف النمو)، أما في هذه الحال فلابد من اللجوء إلى عملية أخرى أكثر جذرية وهي تمرير الخلايا.

2- تمرير الخلايا cell passaging

يقصد بتمرير الخلايا نقل أعداد قليلة من خلايا المزرعة الخلوية إلى زجاجة زرع جديدة لتجنب شيخوخة الخلايا، التي تترافق عادة مع كثافة عالية من الخلايا في المستنبت وتلاحظ عادة في طور الثبات.

وتعتمد طريقة التمرير على نوع المزرعة الخلوية:

أ - في حالة المزارع المعلقة يمزج المستنبت حتى التجانس ثم يؤخذ حجم صغير من معلق الخلايا بالماصة وينقل إلى زجاجة زرع جديدة تحوي وسطاً جديداً.

ب- أما في حالة المزارع الملتصقة فيكون الأمر أكثر تعقيداً، إذ ينبغي سحب الوسط الزرعي المستهلك بالكامل ثم إضافة وقاء مناسب يحوي إنزيم التربسين والحضن في الدرجة 37°م لمدة 10دقائق من أجل انفصال الخلايا عن سطح الزجاجة وعن بعضها بعضاً والانتقال إلى الحالة المبعثرة (تشبه عملية تفريق خلايا عينة نسيجية)، نضيف بعد ذلك محلول مثبطات التربسين trypsin inhibitors، ويمكن الاستعاضة عن ذلك بإضافة كمية من مصل جنين الحصان لأنه يحوي مثبطات التربسين، وبذلك نحصل على معلق خلوي ويمكننا المتابعة كما في حال المزارع المعلقة.

ملاحظة: يجب أن ندون دوماً على زجاجة الزرع عدد مرات التمرير Passage Nr. التي خضعت لها الخلايا، يختلف عدد مرات التمرير التي يمكن إجراؤها من خط إلى خط خلوي آخر، فبالنسبة للخلايا السرطانية يتراوح عدد مرات التمرير الممكنة من 80 إلى 120 مرة.

الفصل الثاني

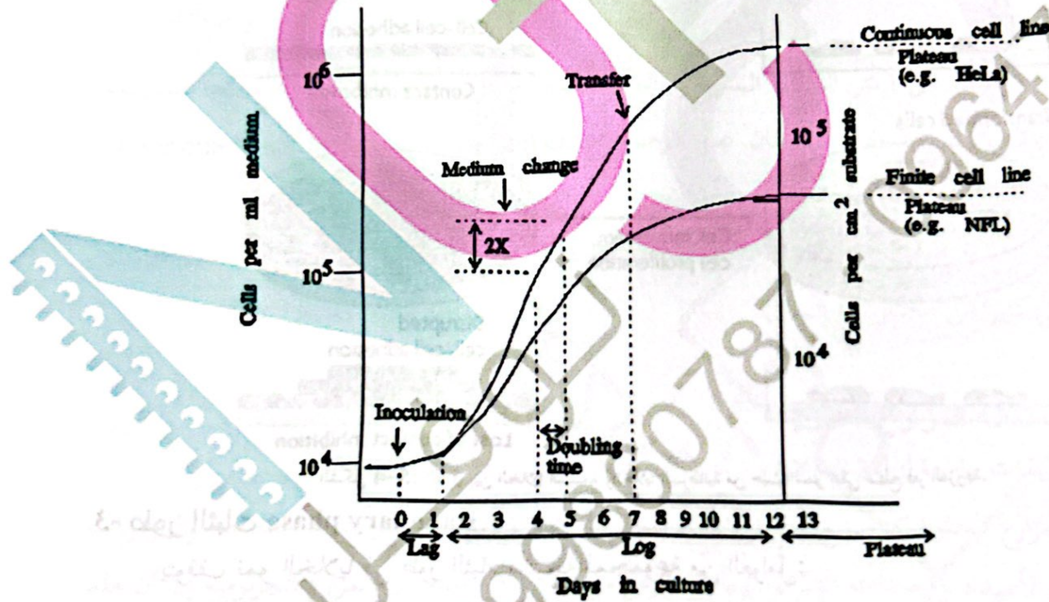
نمو الخلايا و التغيرات التي تطرأ عليها

أولاً- نمو الخلايا ومراحله

يمر أي مستنبت خلوي بالمراحل المبينة في الشكل 4-4 وتتضمن:

1- طور الكمون أو الاعتياد lag phase:

وهو المدة الزمنية التي تحتاجها الخلايا لتجاوز صدمة الانتقال وبدء التأقلم مع الوسط الجديد، قد يطول طور الكمون أو يقصر تبعاً لنوع الخلايا وتركيبة الوسط وشروط الحضن.



الشكل 4-4: مراحل نمو المزرعة الخلوية

يكون طور الكمون عموماً قصيراً في مزارع الخلايا السرطانية وذلك للأسباب الآتية:

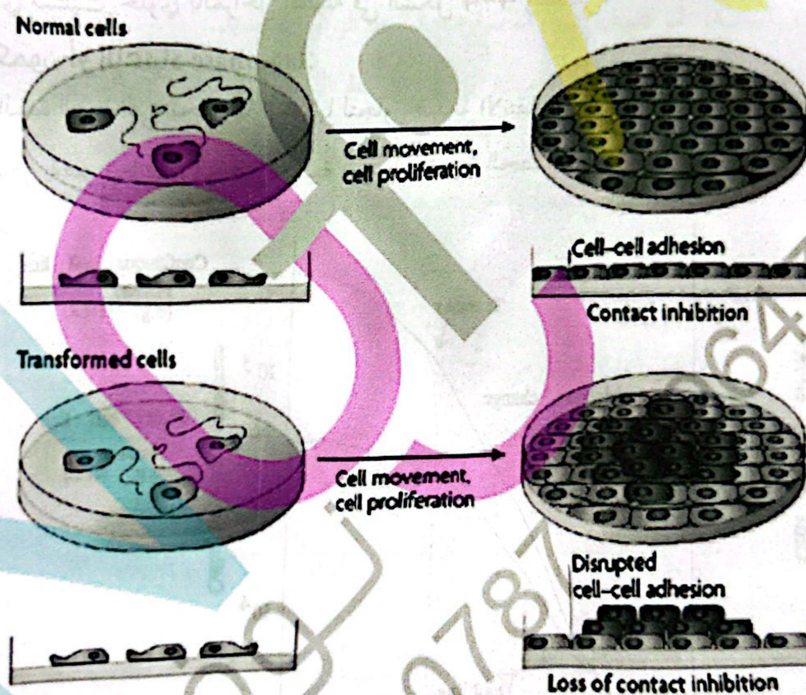
- لا تحتاج الخلايا السرطانية لأن تنتج المطرس الذي يربط الخلايا مع بعضها ويربطها بسطح قعر زجاجة الزرع، فهي لا ترسو على القعر وتنمو بشكل معلق في المزرعة.

- لا تعاني الخلايا السرطانية من صدمة الانتقال ولا تحتاج إلى إضافة عوامل النمو، فهي تنتج وبشكل ذاتي عوامل النمو اللازمة .

إن إضافة مصل جنين الحصان إلى الوسط الزرعي يساعد الخلايا على تجاوز صدمة الانتقال، لأنه غني بعوامل النمو مما يؤدي إلى تقصير طور الكمون بشكل ملحوظ، إضافة إلى احتوائه على مضادات التربسين بشكل طبيعي.

2- طور النمو الأسي (اللوغارتمي) Log phase

تنمو الخلايا في هذا الطور وتتكاثر حتى تستعمر كامل مساحة السطح المتاح لها من دون أن تتراكب فوق بعضها بعضاً، أي أنها تشكل طبقة مستمرة وحيدة monolayer طبعاً هذا إذا كانت الخلايا سليمة، أما الخلايا السرطانية أو الخلايا المتحولة فهي تفقد خاصية التثبيط بالتماس، وتنمو متراكبة فوق بعضها بعضاً لتشكل طبقات متعددة (الشكل 4-5).



الشكل 4-5: الفارق بين الخلايا السليمة والخلايا السرطانية من حيث النمو على سطح قعر المزرعة.

3- طور الثبات stationary phase

يتوقف نمو الخلايا في طور الثبات نتيجة لمجموعة من العوامل:

- استهلاك المواد المغذية الموجودة في الوسط.
- تراكم المستقلبات والفضلات.
- عدم توافر سطح إضافي لترسو عليه الخلايا وتنمو من دون أن تتراكب فوق بعضها.

- ظاهرة التثبيط بالتماس contact inhibition، وتشاهد فقط في حالة الخلايا السليمة، فعند اقتراب الخلايا من بعضها تبدأ بإنتاج إشارات كيميائية تثبط نمو الخلايا المجاورة أما في حال الخلايا السرطانية فتكون هذه الآلية غائبة نتيجة لطفرات فيها.

ثالثاً- تلوث الخطوط الخلوية

من الضروري جداً عند زرع الخلايا العمل في شروط عقيمة وجو معزول (laminar flow) لأنه من السهل جداً أن تتلوث مزارع أو خطوط الخلايا cell lines بأحد الملوثات الآتية:

1- التلوث بالكائنات الحية الدقيقة، وللتقليل من حدوث ذلك تضاف الصادات الحيوية إلى الوسط الزرعي، ويبقى الأهم من ذلك هو فصل مخبر زراعة الخلايا عن مخبر الأحياء الدقيقة.

2- التلوث المتصالب بالخطوط الخلوية، يعد هذا النوع من التلوث سيء نظراً لصعوبة تجنبه، لاسيما إذا كنا نعمل في المخبر في آنٍ على أنواع عدة من الخطوط الخلوية، فهناك احتمال قائم دوماً لتلوث هذه الخطوط ببعضها وفقدان نقاوة تلك الخطوط.

3- التلوث بخطوط الخلايا السرطانية، يعد من أخطر أنواع التلوث نظراً لسرعة تكاثر الخلايا السرطانية ومقاومتها واتصافها بالخلود immortal، بمجرد دخول خلية منها إلى مزرعة من الخلايا السليمة، تبدأ بالتكاثر فيها وتطغى على خلايا الخط ذاته لينتهي الأمر بفقدان خط الخلايا السليمة بالكامل لصالح الخلايا السرطانية.

تُعدّ خلايا Hela من أكثر الخلايا السرطانية المعروفة بقدرتها على تلويث الخطوط الخلوية السليمة، وهي مأخوذة بالأصل من خزعة من سرطان عنق الرحم cervical cancer لمريضة تدعى Henrietta Hela، أصيبت بسرطان عنق الرحم وتوفيت نتيجة له.

استعملت خلايا Hela على نطاق واسع في الأبحاث المخبرية حول العالم حتى أصبحت أداة لا يستغنى عنها في كثير من مخابر زرع الخلايا.

ثالثاً- تطبيقات تقانة المزارع الخلوية

توجد تطبيقات واسعة لزراعة الخلايا من أهمها:

1- استعمال المزارع الخلوية كمصانع حيوية لإنتاج المواد التي تهمنا (من مثل البروتينات العلاجية والهرمونات والأنزيمات والأضداد ومضادات السرطان)، على الرغم من أنه يمكن استعمال المزارع الجرثومية إلا أن هذه المزارع تبقى عاجزة عن تصنيع البروتينات المعقدة والمكونة من وحدات عدة، كما أن البروتينات التي تخضع لتعديلات بعد اصطناعها كإضافة زمر سكرية لا يمكن إنتاجها إلا في حقيقيات النوى لأن الجراثيم تفتقر إلى الإنزيمات الضرورية لذلك.

2- دراسة العمليات الحيوية التي تحدث داخل الخلية، من مثل التضاعف، الانتساخ، الترجمة، دراسة حركية الرنا، انتقال المستقبلات، عمليات نقل الإشارة، حيث تكون هذه الدراسات أسهل على الخلايا المزروعة.

3- دراسة التأثرات بين الخلايا cell-cell interactions والأمراض الناجمة عن الخلل في تواصل الخلايا مع بعضها.

4- فهم آليات عمل بعض الأدوية.

5- دراسة المادة الوراثية للخلية.

6- هندسة النسج: تعد المزارع الخلوية وخصوصاً مزارع الخلايا الجذعية خطوة أولية على طريق تنمية نسج بأكملها خارج الجسم الحي ex-vivo.

7- دراسة شيخوخة الخلايا وآليات الموت الذاتي apoptosis.

8- دراسة تغيرات مكونات البلاسما الخلوية مع الزمن لأن تركيبها غير ثابت، حيث يتغير محتواها من البروتينات مع مرور الزمن.

رابعاً- أهم الخطوط الخلوية الشائع استعمالها

1- خطوط خلوية بشرية Human Cell Lines :

- خط HELA مأخوذ من سرطان عنق الرحم.
- خط Lncap مأخوذ من سرطان البروستات.
- خط MCF-7 مأخوذ من سرطان الثدي (كذلك خط T47-D).
- خط THP-1 مأخوذ من ورم نقوي حاد acute myeloid leukemia.
- خط U87 مأخوذ من ورم أرومات الدبق glioblastoma.

2- خطوط خلوية ورمية فأرية :

- خط MC3T3 (embryonic clavarial).
- خط C3H10T1/2 (embryonic mesenchymal).

3- خطوط خلوية من حيوانات أخرى:

- خط ZF4 (Zebra fish) الأسماك المخططة.
- خط CHO (chinese hamster ovary) مبيض الهامستر الصيني.
- خط MDCK من خلايا ظهارة كلية Madin Darby Canine.

4- خطوط خلوية من اللافقاريات:

خط C6/C3 وهو خط خلوي من يرقة بعوضة الفهد الآسيوي.

5- خطوط خلوية نباتية:

خط BY-Z من نبات التبغ.